

**WIRKUNG VON ERYTHROPOETIN
AUF DIE DNS-SYNTHESE-
GESCHWINDIGKEIT DIFFERENZIERENDER
ERYTHROPOETISCHER
KNOCHENMARKSZELLEN**

Franz Hegemann

1975

Aus dem Institut für Hämatologie der GSF,
Assoziation mit EURATOM, München
(Komm. Leiter Priv. Doz. Dr. St. Thierfelder)

WIRKUNG VON ERYTHROPOETIN AUF DIE DNS-SYNTHESE-
GESCHWINDIGKEIT DIFFERENZIERENDER ERYTHROPOETISCHER
KNOCHENMARKSZELLEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der gesamten Medizin
verfaßt und
einer hohen medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Franz Hegemann
aus München

München 1974

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: PD. Dr. P. Dörmer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Marx

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 4.2.1975



INHALTSÜBERSICHT

- A. Übersicht über die humorale Regelung der Erythropoese
 - I. Erythropoetin
 - II. Inhibitoren der Erythropoese
- B. Besondere Probleme bei der Beurteilung von Erythropoetinwirkungen
 - I. Unterscheidung von Stammzellwirkungen und Wirkungen an differenzierten Zellen
 - II. Experimenteller Beitrag der eigenen Untersuchungen
- C. Material und Methode
 - I. Gewinnung der ESF-Präparate
 - II. Suppression der Erythropoese
 - III. Fe-Einbauversuche
 - IV. Bestimmung der DNS-Synthesegeschwindigkeit
- D. Ergebnisse
- E. Diskussion
 - I. Interpretation der Meßergebnisse
 - II. Lokalisierung des primären ESF-Stimulus
 - III. Frage der unterschiedlichen Beeinflussung unterschiedlicher Erythroblastenformen durch ESF
 - IV. Inhibitorische Wirkungen der untersuchten Urinpräparate
- F. Zusammenfassung
- G. Literatur

A. ÜBERSICHT ÜBER DIE HUMORALE REGULATION DER ERYTHROPOESE

Seit Paul Carnot (1869 - 1957) ist die Existenz eines humoralen Regulationssystems der Erythropoese vermutet und inzwischen auch häufig bestätigt worden. Neben dem seit langem bekannten Vorkommen der spezifischen erythropoese-fördernden Substanz "Erythropoetin" konnte in jüngerer Zeit auch die Existenz erythropoese-hemmender Stoffe (Inhibitoren) gesichert werden (122, 125, 127, 168, 183, 203). Weitgehend ungeklärt allerdings sind bisher Chemismus und Wirkungsmechanismen der Substanzen, sowie ihre Bedeutung oder Beteiligung bei unter zahlreichen klinisch-pathologischen oder experimentellen Bedingungen beobachteten Veränderungen der Erythropoese im Sinne einer vermehrten oder verminderten Produktion roter Blutkörperchen. Ungeklärt ist bisher auch, ob andere Regelmechanismen, vor allem neurale Stimuli und Einflüsse des "microenvironment", zusätzlich oder in Wechselbeziehung mit den humoralen eine wesentliche Rolle spielen (7, 68, 89, 180, 195).

In der nachfolgenden Tabelle wird versucht, die zahlreichen pathologischen Vorgänge oder experimentellen Manipulationen, bei denen Veränderungen der Erythropoese beobachtet werden, mit dem Auftreten der bisher bekannten humoralen Steuersubstanzen in Zusammenhang zu bringen:

Tab. 1: Übersicht über die experimentell oder klinisch beobachteten Veränderungen der Erythropoese und die jeweilige Beteiligung spezifischer humoraler Regulationsfaktoren.

Zeichenerklärung: +: Zunahme des Faktors in Blut oder Urin
 Ø od. -: Abnahme des Faktors in Blut oder Urin
 (Verminderungen des ESF-Spiegels können wegen der unzureichenden Empfindlichkeit biologischer Tests meist nicht sicher nachgewiesen werden. Sie sind aber zu vermuten, wenn z.B. nach Hypoxiereiz kein adäquater ESF-Anstieg mehr erfolgt, oder wenn ein Zustand verminderter Erythropoese angetroffen wird, welcher durch Zufuhr von exogenem ESF vollständig aufgehoben werden kann.)

Abkürzungen: ESF (erythropoiesis stimulating factor)
 REF (renal erythropoiesis stimulating factor)

	Erythro- poese	ESF	REF	Inhibi- toren	andere humorale Faktoren	Literatur
I. <u>Veränderungen des peripheren Blutes und der Blutgase</u>						
Hypoxie	gesteig.	+	+	- (?)		44, 54, 67, 106, 107, 129, 187, 207
Blutverlust	gesteig.	+	+	- (?)		1, 88, 106, 107, 181
Hämolyse	gesteig.	+				36, 88, 106, 131
Polyglobulie (nach Hypertransfusion od. Hypoxie)	vermind.	-	-	+		4, 22, 34, 67, 98, 105, 201, 202
pO ₂ -Anstieg	vermind.	-				129
pCO ₂ -Anstieg		-				37
Anämie mit primär myeloischer od. zellulärer Ursache, Fe-Mangel-Anämie	vermind.	+				35, 36, 39, 77, 78, 145, 170, 200
II. <u>Veränderungen der Niere oder der Nieren-Funktion</u>						
Urämie, chron. Niereninsuffizienz vermind.		-		+		34, 39, 124, 127, 140, 142, 148
Akute Glomerulonephritis	vermind.			+		143
Preteriligatur, Nephrektomie	vermind.	-				54, 140, 179
Nierentumoren (Adenome, Carzinome, Sarkome)	gesteig.	+	+	- (?)		57, 138, 162, 199
Hypoxie der Nieren, Nierenarterienstenose und -konstriktion	gesteig.	+	+			47, 67
Nierentransplantation	gesteig.	+				24, 57, 138, 145
Hydronephrose, Nierenzysten						

Erythro- poese	ESF	REF	Inhibi- toren	andere humorale Faktoren	Literatur
-------------------	-----	-----	------------------	--------------------------------	-----------

III. Veränderungen an der Leber

Hepatektomie	vermind.	-		Leber- faktor Ø	95, 192
--------------	----------	---	--	--------------------	---------

IV. Hormone und andere

Wirkstoffe

Vasopressin, Aldosteron, Thyreoidhormone	gesteig.	+	+		57, 68, 161
Angiotensin, Norepinephrin, 5-Hydroxytryptamin	gesteig.	+			46, 47, 68
Testosteron, Cobalt	gesteig.	+	+	-	44, 48, 54, 67, 107, 129 147, 161, 167, 204
Corticoide (Wirkung dosisabhängig)	gesteig. o/vermind.	+	+	Serum- (Leber-) faktor Ø	68, 161
Östradiol	vermind.	-		Serum- (Leber-) faktor Ø	68, 163
Homogenate von Lunge, Niere, Magen, Darm Milz, Leber, Muskel	vermind.		+		33

V. ZNS und Nervensystem

ACTH, STH	gesteig.	+	+		68, 92, 161
Prolactin	gesteig.	+			68
Hypothalamusreizung	gesteig.	+	+(?)		68, 75, 76, 138, 159
Hypophysektomie, Atropingabe	vermind.	-			93, 159

VI. Andere mit Anämie oder

Polycythämie verbundene

klinisch-pathologische

Zustände

Chron. Infekte, Entzündun- gen, Tumorleiden; chron. Niereninsuffizienz ("Anämie bei chron. Erkrankungen")	vermind.	-	+(?)		34, 39, 82, 121, 124, 127, 140, 142, 148, 178
Aplastische Anämien	vermind.		+		124, 126, 127, 162
Anämien bei Autoimmun- erkrankung	vermind.	-(?)	+		94, 101, 109, 162
Anämien mit primär myelo- ischer Ursache (Markde- struktion, ineffektive Erythropoese, Fe-Mangel)	vermind.	+			35, 36, 39, 77, 78, 145, 170, 200
Tumoren mit Polycyt- hämie (Cerebellare Hämangioblastome, Leber- tumoren, Nebennierentumoren)	gesteig.	+	-(?)		57, 162, 199
Polycythämia vera	gesteig.	-	-(?)		125, 143
Neugeborenen-Status	vermind.		+		183
Mangelernährung	vermind.	-			22, 90

Die wichtigsten Einzelheiten über bisher bekannte Regulations-
substanzen sollen kurz zusammengefaßt werden:

I. Erythropoetin

1. Definition

Erythropoetin (EP) oder erythropoiesis stimulating factor (ESF) ist eine spezifisch die Erythropoese stimulierende Substanz, die bei zahlreichen Zuständen mit stimulierter Erythropoese in Plasma und Urin von Patienten und Versuchstieren gefunden wird (Tab. 1) und von dort gewonnen werden kann. Die Wirkungen der Substanz scheinen klassen- aber nicht artspezifisch zu sein (65).

Es wurden zahlreiche Versuche durchgeführt, die erythropoetisch aktive Substanz aus den obengenannten Quellen zu isolieren und in Reinform darzustellen (3, 131, 132). Besondere Fortschritte auf diesem Gebiet wurden beispielsweise von E. Goldwasser et al. (63, 64) erzielt, welche aus Schafplasma durch zahlreiche Fraktionierungs- und Anreicherungsschritte, d.h. durch Aneinanderreihung von Dialysier-, Chromatographie-, Ionenaustausch-, Präzipitations- und Ultrafiltrations-Vorgängen eine Substanz gewinnen konnten, die bezüglich der biologischen Wirksamkeit eine Aktivität von über 8.000 IU/ml (Internationale Einheiten pro ml) aufwies. Das bedeutet eine gegenüber dem Ausgangsmaterial erzielte Konzentrationssteigerung um den Faktor 1.000.000. Die Fraktion konnte in der Gel-Elektrophorese als einzelne, annähernd homogene Zacke dargestellt werden, welche das Vorliegen einer nahezu einheitlichen Molekülstruktur vermuten ließ (64).

Es ist allerdings darüber hinaus wegen der sehr verlustreichen Reinigungsprozesse nicht gelungen, genügend Reinsubstanz für umfänglichere chemische Analysen zu gewinnen. Die Substanz ist

deshalb vorläufig nur unzureichend und widersprüchlich charakterisiert: einige Autoren beschreiben Glycoproteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10.000 und 70.000, andere haben lipidähnliche Stoffe gefunden (38, 63, 64, 68, 73, 131). Es bestehen nicht einmal schlüssige Beweise dafür, daß es sich bei dem als "Erythropoetin" bezeichneten Wirkstoff um eine einheitliche Substanz von konstanter Zusammensetzung handelt; vielmehr sind zahlreiche verschiedene erythropoesestimulierende Substanzen von unterschiedlicher Struktur und Zusammensetzung, möglicherweise auch mit unterschiedlichen Wirkungsspektren, innerhalb einer Spezies oder sogar eines Individuums denkbar (29, 38, 40, 68, 73, 109, 131).

Demnach können die zahlreichen erythropoetisch wirksamen Präparate, die man aus Plasma und Urin nach unterschiedlichen Methoden gewinnt (42, 51, 100), vorerst nur durch Beschreibung ihrer biologischen Wirkung in vivo oder in vitro definiert und durch Messung dieser Wirkung quantifiziert werden.

2. Nachweis und Standardisierung

a) Biologische Methoden:

Der klassische und am häufigsten benutzte quantitative ESF-Nachweis ist die Messung der Fe-Inkorporation in die polyglobule Maus (18, 22, 97, 182). Hierbei wird dem Versuchstier 1 - 2 Tage nach ESF-Gabe ⁵⁹Fe injiziert, welches nach weiteren 1 - 2 Tagen im peripheren Blut nachgewiesen werden kann. Der Betrag des dort insgesamt gemessenen, markierten Fe ist gegenüber unstimulierten Kontrolltieren deutlich erhöht, und zwar besteht eine annähernd logarithmische Beziehung zwischen ESF-Dosis und Fe-Inkorporation (18, 19, 97, 182). Der dieser Meßmethode zugrundeliegende entscheidende biologische Vorgang ist die nach ESF vermehrte Bildung

und Ausschwemmung roter Zellen und damit auch markierten Hämoglobins.

Der gleiche Effekt liegt auch einer anderen häufig angewandten Methode zur ESF-Testung, nämlich der Zählung der vermehrten Retikulozyten im peripheren Blut (58, 59, 93), oder der seltener angewandten Bestimmung des Serum-Fe-Umsatzes (81, 88, 91) zugrunde. Polyglobule Versuchstiere werden bei ESF-Nachweisen deshalb verwendet, weil sie infolge Unterdrückung der physiologischen Erythropoese besonders gut meßbare Wirkungen nach exogen zugeführtem ESF zeigen (58, 59, 72).

b) Immunologische Methoden:

In letzter Zeit sind modernere, immunologische Nachweismethoden entwickelt worden; diese sind empfindlicher als die biologischen. So können vergleichsweise an der polyglobulen Maus 20 - 50 μ U, im Radioimmuno-Versuch ca. 10 μ U, im Immunodiffusionsversuch ca. 0,5 μ U, im Hämagglutination-Inhibitions-Versuch ca. 0,0087 μ U Erythropoetin als minimale Dosis nachgewiesen werden (22, 42, 50, 61, 72, 115, 118). Alle immunologischen Nachweis- und Standardisierungsmethoden sind allerdings wegen der zur Immunisierung verwendeten nicht völlig gereinigten und möglicherweise aus unterschiedlichen ESF-Faktoren zusammengesetzten Präparate nicht ausreichend spezifisch (42, 61, 118).

3. Entstehung

Vermutlich wird die aktive ESF-Form - ähnlich wie beim Gerinnungssystem - erst im Plasma aus mehreren Einzelfaktoren gebildet. Als Vorläufer wurden bisher 2 Faktoren gefunden:

Ein Nierenfaktor (REF, renal erythropoiesis stimulating factor) findet sich, insbesondere nach Stimulierung der Erythropoese durch

Blutung, Hypoxie, Injektion von Cobalt oder Androgenen, in bestimmten subzellulären Fraktionen von Nierengewebe (21, 41, 68, 69, 107, 146, 192, 204). Ein zweiter Faktor, ein den Globulinen angehörendes Serumprotein, wird vermutlich in der Leber synthetisiert (68, 95, 107, 192). Beide Faktoren ergeben nach gemeinsamer Inkubation in vitro ein aktives ESF-Präparat mit deutlicher Wirkung an der polyglobulen Maus (21, 33, 67, 68, 107, 207). Der eigentliche Aktivierungsvorgang ist als Enzym-Substrat-Reaktion (21, 68), als Bildung eines Hormon-Carrier-Komplexes (21, 68), oder als Freisetzung von ESF aus einem ESF-Inhibitor-Komplex (33, 96, 207) vorstellbar. Offenbar gibt es außer den oben genannten auch noch andere Entstehungsweisen und Synthesorte von erythropoetisch wirkenden Substanzen, da häufig auch in nephrektomierten Patienten und Versuchstieren deutlich meßbare ESF-Spiegel beobachtet wurden (68, 139).

4. Physiologische und klinische Bedeutung

Die in Klinik und Experiment häufig beobachteten Tatsachen, daß

- die physiologische Erythropoese im Tierversuch durch Anti-ESF völlig zum Stillstand gebracht werden kann (176, 178),

- die pathologischen Zustände der Erythropoese im klinischen Bereich meist mit charakteristischen Veränderungen des ESF-Spiegels verbunden sind (56, 191, 200),

lassen Erythropoetin als wesentlichen, vielleicht sogar einzigen Erythropoese-steuernden Faktor unter physiologischen und pathologischen Bedingungen, bzw. als letztendliche gemeinsame Wirksubstanz aller bekannten und unbekannten Regelsysteme der Erythropoese erscheinen. Eine eindrucksvolle Analyse der klinischen Bedeutung von ESF gibt Hillmann (82): Danach sind alle klinisch beobachteten hyperproliferativen Zustände der Erythropoese mit Ausnahme der primär neoplastischen (Polycythämia vera, Erythrämie) auf ESF-Über-

schuß zurückzuführen; während andererseits der klinisch häufigsten Anämieform, der hypoproliferativen Anämie im Gefolge chronischer Krankheiten (Tumoren, Infektionen, Entzündungen, Hypometabolismus, chron. Nierenkrankheiten) in der Regel, soweit keine spezifischen Ursachen (Fe-Mangel, Markdestruktion) nachweisbar sind, ein Mangel an ESF-Stimulation zugrunde liegt.

II. Inhibitoren der Erythropoese

1. Definition

In den letzten Jahren wurde zunehmend von Erythropoeseinhibitoren berichtet, welche - ähnlich wie ESF - in Plasma und Urin zahlreicher Individuen vorkommen und, in Versuchstiere injiziert, deren Erythropoese hemmen (105, 168, 183, 201, 202, 203). Sie werden meist in Analogie zu ESF als EIF (erythropoiesis inhibiting factor) bezeichnet.

Moderne, allerdings spekulative, Deutungen der Erythropoesesteuerung gehen davon aus, daß die Aktivität der Erythropoese von vornherein durch ein duales humorales System, also durch Zusammenwirken von ESF und EIF, festgelegt wird, wobei die beiden Anteile in Form von Einzelsubstanzen oder an einen gemeinsamen Molekülkomplex gebunden vorliegen könnten (122, 128, 143).

Über Zahl, Zusammensetzung, Struktur, Synthese, Wirkungsorte und -mechanismen der Inhibitoren ist bisher wenig bekannt. Neben einigen Stoffen mit nicht ausschließlich spezifischer Inhibitorfunktion, wie Neuraminidase, Endotoxine, Östrogene, Corticoide (68, 163, 178, 196), scheinen sich nach den bisherigen Beobachtungen folgende Gruppen spezifischer Erythropoeseinhibitoren abzuzeichnen:

a) Anti-ESF ist der bisher wohl am besten definierte Inhibitor (104, 116, 117, 131, 176, 178). Er wird routinemäßig durch Injektion von ESF-Präparaten in Versuchstiere erzeugt und findet verbreitete Anwendung zur experimentellen ESF-Hemmung und für immunologische ESF-Nachweise (42, 53, 54, 61, 118, 120, 132, 175). Der Inhibitor findet sich in der Gamma-Globulin-Fraktion der Serum-elektrophorese, neutralisiert spezifisch alle ESF-Wirkungen und zeigt alle Merkmale eines spezifisch gegen ESF gerichteten Antikörpers (131, 176, 178). Er wird demzufolge vermutlich in den Zellen des Immunsystems synthetisiert.

Anti-ESF kommt vermutlich nicht als physiologischer Regulator der Erythropoese in Betracht; es spielt möglicherweise jedoch bei Autoimmunerkrankungen, welche mit Anämien verbunden sind, eine gewisse Rolle. So beschreiben Jepson und Lowenstein (94) - neben mehreren anderen Autoren (101, 162) - Patienten, die neben einer isolierten Aplasie der roten Knochenmarkszellen auch andere immunologisch bedeutsame Symptome, wie Thymom, erhöhte Serum-Globuline, Eosinophilie und im Knochenmark vermehrt Plasmazellen und kleine Lymphozyten aufwiesen. Das Serum dieser Patienten hemmte nach Injektion in die polyglobule Maus deren ⁵⁹Fe-Einbau, was die Autoren auf einen gegen ESF gerichteten Antikörper zurückführen.

b) Chalone: Diese relativ gut definierten Inhibitoren hemmen die Zellproliferation vermutlich durch Blockierung des Übergangs von der G₁- zur S-Phase, möglicherweise auch von der G₂-Phase zur Mitose (17, 156). Der Hemmstoff wirkt definitionsgemäß immer auf die Zellart zurück, von der er synthetisiert wird und hat demnach offenbar die Aufgabe, die Größe des Zellpools nach oben hin zu limitieren (product inhibition) (17, 98, 173). Das Inhibitorsystem, welches ursprünglich an der Epidermis entdeckt wurde, konnte zwischenzeitlich auch in zahlreichen anderen Geweben, wie Lunge,

Leber, Nieren und insbesondere auch in hämopoetischen Zellen der granulo- und erythropoetischen Reihe nachgewiesen werden (8, 98, 134, 155, 156, 171, 173, 174).

Ob es eine wesentliche Rolle bei der physiologischen Steuerung der Erythropoese spielt, ist angesichts des Wirkungsmechanismus zweifelhaft; seine pathologischen Bedeutungen sind weitgehend ungeklärt.

c) Es existieren zweifellos noch andere Inhibitoren der Erythropoese, welche allerdings bisher nicht so gut abgegrenzt sind wie die oben genannten. So konnte z.B. mit Extrakten aus zahlreichen Organen wie Niere, Magen, Darm, Lunge eine Hemmung der Erythropoese im Fe-Einbauversuch nachgewiesen werden (33). Am besten untersucht sind bis jetzt Inhibitoren aus Nierenextrakten, über welche detailliertere Angaben zur Verfügung stehen. Es handelt sich offenbar um lipidähnliche Substanzen, die möglicherweise zu einer Deaktivierung des Erythropoetin durch Abspaltung aktiver Wirkgruppen (107), oder aber zur reversiblen Neutralisierung von ESF durch vorübergehende Bildung eines ESF-Inhibitor-Komplexes (33, 96, 207) fähig sind. Diese Eigenschaft läßt sie, zusammen mit der Tatsache, daß sie mit ESF bzw. dessen Teilfaktoren die Niere als Syntheseort gemeinsam haben, als physiologische ESF-Antagonisten und damit als reguläre Faktoren der Erythropoesesteuerung in Betracht kommen. Beweise hierfür liegen jedoch nicht vor. Renale Erythropoeseinhibitoren scheinen eine gewisse Rolle bei mit Anämie einhergehenden Nierenerkrankheiten zu spielen (124, 142, 143).

2. Experimenteller Nachweis

Inhibitorwirkungen werden meist durch Reduzierung der Erythropoese in der normalen Maus, bzw. in der polyglobulen Maus durch Hemmung der Erythropoesesteigerung auf Hypoxie oder exogene ESF-Standarddosis (beides meist gemessen mit der Fe-Einbau-Methode) nachgewiesen (105, 124, 133, 143). Bei allen experimentell beobachteten Inhibitionsphänomenen ist eine sichere Unterscheidung zwischen der Wirkung eines spezifischen physiologischen Inhibitors mit Regelsubstanzcharakter und anderen unspezifisch zellschädigenden Einflüssen nicht möglich.

B. BESONDERE PROBLEME BEI DER BEURTEILUNG VON ERYTHROPOETIN- WIRKUNGEN

I. Unterscheidung von Stammzellwirkungen und Wirkungen an differenzierten Zellen

Eine zentrale Rolle bei der Diskussion von ESF-Wirkungen nimmt die Frage ein, auf welche Zellgruppen, genauer, auf welche Reifungsstufen der Erythropoese die ESF-Wirkung primär gerichtet ist:

1. Wirkung auf die hämopoetische Stammzelle

Die am einfachsten zu beobachtende und deshalb am längsten bekannte ESF-Wirkung ist die Zunahme der Zellzahl im Erythroblastenkompartiment und die darauffolgende vermehrte Ausschüttung roter Zellen ins periphere Blut (30, 59, 72, 175, 205, 206). Diese Erscheinung ist besonders eindrucksvoll am polyglobulen Versuchstier, in welchem die normale sichtbare Erythropoese fast völlig aus Knochenmark oder Milz verdrängt ist. In diesen Geweben kann nach ESF-Gabe eine charakteristische erythropoetische Welle beobachtet werden, welche etwa 15 - 20 Stunden nach Stimulus mit dem Auftreten von Proerythroblasten beginnt, sich mit den nachfolgenden regulären Reifeteilungen in Basophile- und Polychromatische Erythroblasten fortsetzt und nach etwa 3 - 4 Tagen mit der Ausschüttung von Retikulozyten in die Peripherie endet (38, 58, 59, 68, 73, 86, 92, 144, 152).

Diese zahlenmäßige Vermehrung erythropoetischer Zellen wird nach der in der Literatur vorherrschenden Meinung einer unmittelbaren ESF-Einwirkung auf die morphologisch nicht identifizierbare hämopoetische Stammzelle zugeschrieben, welche hierdurch in die erythropoetische Differenzierung "getriggert" wird (4, 68, 70, 72,

79, 86, 100, 102, 103, 111, 113, 149, 150, 151, 152, 176, 185, 186, 188, 191, 205). Über Einzelheiten dieses Vorgangs, die mögliche Beteiligung unterschiedlicher Stammzelltypen (omnipotente und erythropoetin-sensitive Stammzelle), sowie die zugehörigen Mechanismen zur Wiederauffüllung des entleerten Stammzellkompartimentes existieren zahlreiche Modellvorstellungen (23, 52, 84, 86, 87, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 176, 177, 185, 186, 191).

Die beschriebene Steigerung der Stammzelldifferenzierungsrate wurde lange Zeit als der einzige Mechanismus angesehen, über den ESF die Erythropoese steuert. In jüngerer Zeit sind die Meinungen hierüber eher gespalten. Während einige Autoren an der Theorie der alleinigen Stammzellwirkung festhalten (4, 5, 6, 31, 32), scheint anderen eine zumindest zusätzliche Beeinflussung differenzierter erythropoetischer Zellen möglich zu sein (siehe nächster Abschnitt).

2. Mögliche Wirkungen auf differenzierte Zellformen

Insbesondere mit der zunehmenden Anwendung verfeinerter Beobachtungsmethoden, wie Bestimmung von Markierungs- und Mitoseindizes, Zählung markierter und blockierter Mitosen, Silberkornzahl-Halbwerts- oder Doppelmarkierungstechniken, konnten nach ESF-Stimulus auch Veränderungen im Verhalten differenzierter erythropoetischer Zellen, besonders in der Proliferations- und Reifungskinetik dieser Zellen festgestellt werden:

So beschreiben einige Autoren Verkürzungen der Generationszeit (68, 79, 80, 130, 149), der G_1 - und G_2 -Phase (80, 193), der S-Phase (80, 193), der Kompartiment-Passagezeit proliferierender (79, 193) und nicht-prolierierender Reifestufen (10, 86, 193) und der totalen Knochenmarks-Passagezeit (79, 81, 190, 204). Die Gesamtzahl der Reifeteilungen wird teils vergrößert, teils verkleinert, teils unverändert gefunden (10, 12, 13, 79, 130, 179, 188, 190). Häufig wird eine verfrühte Ausschüttung von Retikulozyten

- seltener auch von kernhaltigen Zellen - beobachtet, wodurch vergrößerte unreife Zellen mit verkürzter Lebensdauer in die Peripherie gelangen (9, 12, 13, 81, 86, 141, 165, 185, 186, 188).

Andererseits ist die Ausreifungszeit der Retikulozyten im peripheren Blut häufig verlängert (32, 82).

ESF-Wirkungen auf das differenzierte Kompartiment konnten allerdings bislang noch nicht von allen diesbezüglich interessierten Untersuchern experimentell bestätigt werden (4, 5, 6, 31, 32); sie haben deshalb, im Gegensatz zum Stammzellmechanismus, bisher noch keine allgemeine Anerkennung gefunden.

Es besteht zudem bis jetzt keine Klarheit darüber, ob die in differenzierten Zellen vorgefundenen ESF-Wirkungen als durch unmittelbaren primären ESF-Einfluß auf diese Zellformen entstanden, oder als sekundäre Folge der Stammzelldifferenzierung, d.h. über die Reifeteilungen von der Stammzelle her übertragen, angesehen werden müssen (60, 79, 108, 163a, 169). Nur wenigen Autoren ist es bisher gelungen durch Anwendung eines der folgenden Verfahren den Stammzeleinfluß weitgehend auszuschalten und damit gewisse Hinweise auf eine unmittelbare ESF-Stimulierung differenzierter Zellen zu erbringen:

- Wahl eines kurzen Zeitraumes zwischen ESF-Stimulus und Messung der differenzierten Zellformen:

Matoth et al. (135, 136, 137) konnten schon 1 - 2 Stunden nach Stimulus Veränderungen der Proliferationsverhältnisse im Erythroblastenkompartiment in Form erhöhter Mitoseindizes nachweisen.

Gordon und Fisher (43, 45, 66, 106) demonstrierten maximal 4 Stunden nach Zugabe von ESF eine Zunahme der Erythroblastenzahl, insbesondere der späten Formen, im Mark isoliert perfundierter Röhrenknochen und eine vermehrte Ausschüttung von Retikulozyten in die Perfusionsflüssigkeit.

- Beobachtungen des Zellflusses an Erythroblasten, welche schon vor ESF-Stimulierung markiert worden waren:

Hanna (79) konnte mit ⁵⁹Fe-Markierung auf diese Weise zeigen, daß die Zahl der Reifeteilungen nach akuter Blutung vergrößert und die Generationszeit der Erythroblasten dementsprechend verkürzt wird.

- Physikalische Abtrennung von Erythroblasten:

An Erythroblasten, welche mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Knochenmark abgetrennt worden waren, fanden Borsook et al. (11) nach ESF gesteigerte Hämoglobinsyntheseraten in allen Einzelzellen, insbesondere auch in den späten Reifungsstufen. Die Tatsache, daß derartige Erythroblastenfractionen nach bisheriger Erfahrung immer auch andere Zellarten, möglicherweise also auch Stammzellen enthalten, ist in diesem Zusammenhang unbedeutend, da allein der kurze Zeitraum von 16 - 20 Stunden zwischen Stimulus und Messung eine zelluläre Übertragung aus dem Stammzellbereich in die späten Reifestufen nahezu unmöglich macht.

II. Experimenteller Beitrag der eigenen Untersuchungen

Unter Bezug auf die geschilderte Problematik wurde in der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen, mögliche Veränderungen der DNS-Synthesegeschwindigkeit kurze Zeit nach ESF-Stimulus direkt in einzelnen Erythroblasten autoradiographisch zu messen und dabei Stammzeleinflüsse weitgehend auszuschließen.

Die bisher schon relativ häufig beobachteten Steigerungen der DNS-Synthese nach ESF wurden in der Regel durch Messung der Einbaugeschwindigkeit eines Precursors in einer Gesamtheit von aus Knochenmark, Milz oder Leber entnommenen hämopoetischen Zellen nachgewiesen (28, 31, 71, 83, 108, 152, 153, 157, 158, 160, 172).

Diese Methode weist gegenüber autoradiographischen Bestimmungen allerdings erhebliche Nachteile auf; sie erlaubt beispielsweise keine gezielte Zuordnung der gemessenen Effekte zur Erythropoese insgesamt oder einzelnen Erythroblastenkompartimenten, und sie kann nicht unterscheiden, ob eine Einbausteigerung durch Zunahme der synthetisierenden Zellfraktion oder durch gesteigerte Syntheseleistung der einzelnen Zellen hervorgerufen wird.

Direkte autoradiographische DNS-Synthesemessungen andererseits wurden in diesem Zusammenhang bisher, vermutlich wegen des großen Arbeitsaufwandes der Silberkornzählung über den einzelnen Zellen, nur sehr selten durchgeführt; die Ergebnisse waren hierbei nicht eindeutig (6, 164).

Variable spezifische Aktivitäten im Precursor-Pool der Zellen wurden dabei bisher nie berücksichtigt.

C. MATERIAL UND METHODE

I. Gewinnung der ESF-Präparate

Als Ausgangsmaterial für die ESF-Präparation diente Urin von Patienten der Universitätskliniken München, insbesondere der I. Medizinischen Klinik, Abt. Hämatologie.

Von jeweils einem Patienten wurde der Urin meist über 24 Stunden gesammelt. Zur Vermeidung bakteriell oder enzymatisch bedingter Aktivitätsverluste wurde dem Sammelgefäß zu Beginn etwas Phenol (ca. 1 g/l) zugegeben und das Gefäß während des Sammelns und im weiteren Verlauf immer eisgekühlt gehalten. Die Aufarbeitung des Urins erfolgte nach einer Methode von A. S. Gordon (65):

Nach Filtrieren des Urins mit gewöhnlichen Papierfiltern wurden jeweils 400 ml Urin mit 1.600 ml Äthanol langsam und schrittweise vermischt, so daß Präzipitation der Urinproteine erfolgte. Das Gemisch blieb anschließend ca. 10 Stunden stehen, um bestmögliches Ausfällen und Absinken des Präzipitats zu erreichen. Alle Manipulationen wurden in einer zeitweise geöffneten Kühltruhe bei durchschnittlich -10°C durchgeführt. Das Präzipitat wurde durch Abgießen des Überstandes und anschließendes Abzentrifugieren in der Kühlzentrifuge bei -10°C gewonnen, in 150 ml 0,8 molarer NaCl wieder gelöst und die Lösung später, nach Abfüllen in einen Cellulose-Dialysierschlauch von etwa 1,5 cm Durchmesser, gegen eine NaCl- und Phosphatlösung ($0,16\text{ molar NaCl} + \text{K H}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{H PO}_4$, pH 7,5, 0,025 molar) dialysiert.

Die Dialyse erfolgte über einen Zeitraum von 4 Tagen bei ca. 0°C , wobei der Dialysierschlauch ständig in einem Gefäß mit 2 l Lösung

rotierte. Jeden Tag wurden 500 ml der Pufferlösung erneuert; am 4. Tag wurde sie durch eine Lösung mit verringertem PO_4 -Anteil (0,16 molar NaCl + 0,006 molar PO_4) aber gleichem pH ersetzt. Nach dem Dialysierprozeß, welcher vorwiegend störende Salze aus dem Urinpräparat eliminieren und Proteine dementsprechend anreichern sollte, wurde die im Schlauch verbliebene Lösung in dünnwandige Glaskolben aufgeteilt, durch Eintauchen in ein Aceton-Trockeneis-Gemisch an der Kolbeninnenwand als dünne Eisschicht aufgebracht und anschließend im Vakuum bei etwa -40°C lyophilisiert. Nach 2 - 3 Tagen erhielt man wenige Gramm eines - je nach Ausgangsmaterial - weißen bis bräunlichen Pulvers, welches bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert wurde. Dieses Material wird nach vergleichbaren Literaturangaben allgemein als "Step 2"-Präparat bezeichnet und kann bei kühler Lagerung jahrelang ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden (22, 132).

II. Suppression der Erythropoese

Die beiden in der Literatur am häufigsten angewandten Standardverfahren zur Erzeugung einer Suppression der Erythropoese im Versuchstier sind:

1. Hypertransfusion (18, 54, 92, 116)
2. Hypoxie (18, 97, 119, 182, 184, 187)

Das Ziel beider Verfahren ist die Erzeugung einer Polyglobulie: dies wird bei der Hypertransfusionsmethode durch Injektion fremder Erythrozyten, bei der Hypoxiemethode durch endogene Überproduktion von Erythrozyten infolge eines artefiziell herbeigeführten Sauerstoffmangels in der Atemluft erreicht. Die Folge der Polyglobulie ist ein Überangebot von Sauerstoff im peripheren Blut, welches zu einem Sistieren der ESF-Produktion und damit zu einem Verschwinden

der Erythroblasten aus den blutbildenden Geweben führt (siehe Tabelle 1). Das Sauerstoffüberangebot kommt selbstverständlich bei der Hypoxiemethode erst nach Rückführung der Versuchstiere in normale Sauerstoffverhältnisse zustande.

Das Maximum der auf diese Weise erzeugten Suppression ist einige Tage nach Abschluß der Polyglobulprozedur erreicht. Zu diesem Zeitpunkt zeigt das Versuchstier die relativ größte Erythropoesesteigerung auf exogen zugeführtes ESF und wird deshalb routinemäßig zur quantitativen Testung zahlreicher ESF-haltiger Flüssigkeiten und Präparate und zur Beobachtung und Messung der verschiedenen ESF-Wirkungen verwendet (67, 72, 93, 116, 132, 182).

1. Hypertransfusion

Anfängliche Versuche mit der Hypertransfusionsmethode erwiesen sich als zu aufwendig und zeitraubend, da für die Transfusion einer Testmaus die Erythrozyten aus 4 anderen Mäusen durch Entbluten gewonnen und aufbereitet werden müssen.

Wir haben deshalb für alle Versuche nur die Hypoxiemethode routinemäßig angewandt.

2. Hypoxie

Bei dieser Methode führt die Reduzierung der arteriellen O_2 -Sättigung infolge Verminderung des alveolären O_2 -Partialdruckes zur Steigerung der Erythropoese, zur Polyglobulie und - nach Absetzen der Hypoxiebehandlung - durch Überschuß an arterieller oder kapillarer O_2 -Sättigung zur Suppression der Erythropoese (siehe Tabelle 1). Die meisten Autoren reduzieren den O_2 -Partialdruck der Atemluft etwa auf die Hälfte (3, 42, 97, 152, 184, 187); dies wird erreicht

a) bei normalem atmosphärischen Druck durch veränderte Mischung der Luftgase:

Normalwerte ca.:	80 Vol.-% N_2	20 Vol.-% O_2
nach O_2 -Reduktion ca.:	90 Vol.-% N_2	10 Vol.-% O_2

b) durch Verminderung des atmosphärischen Druckes und proportionale Senkung der Luftgaspartialdrucke:

Normalwerte ca.:	610 mmHg N_2	150 mmHg O_2
nach O_2 -Reduktion ca.:	305 mmHg N_2	75 mmHg O_2

(für die Druckangaben gilt die Höhe des Meeresspiegels).

Da technische Details über die verwendeten Hypoxiekammern meist nicht angegeben sind, wurde nach eigenem Ermessen ein Gerät entworfen, welches eine Unterdruckbehandlung von 15 bis 20 Mäusen (Methode b) über 10 Tage ermöglichte.

Als Aufenthaltsraum für die Tiere diente eine Glaskammer (Exsikkator) von ca. 10 l Inhalt, welche luftdicht verschlossen und mit einer Membranpumpe evakuiert werden konnte. Dabei waren im einzelnen folgende Bedingungen zu erfüllen:

1. Die geforderte Druckminderung von etwa 0,5 Atmosphären sollte zumindest annähernd genau eingehalten werden.
2. Die Kammer mußte fortlaufend von Frischluft durchströmt werden, um unerwünschte CO_2 -Ansammlung, Anstieg der Luftfeuchtigkeit, und Absinken des O_2 -Partialdrucks unter den beabsichtigten Wert zu verhindern.
3. Die Tiere mußten in der von außen nicht zugänglichen Kammer ständig mit Futter und Trinkwasser versorgt werden.
4. Die ganze Anlage sollte ohne wesentlichen Kontroll- und Regulieraufwand weitgehend automatisch funktionieren.

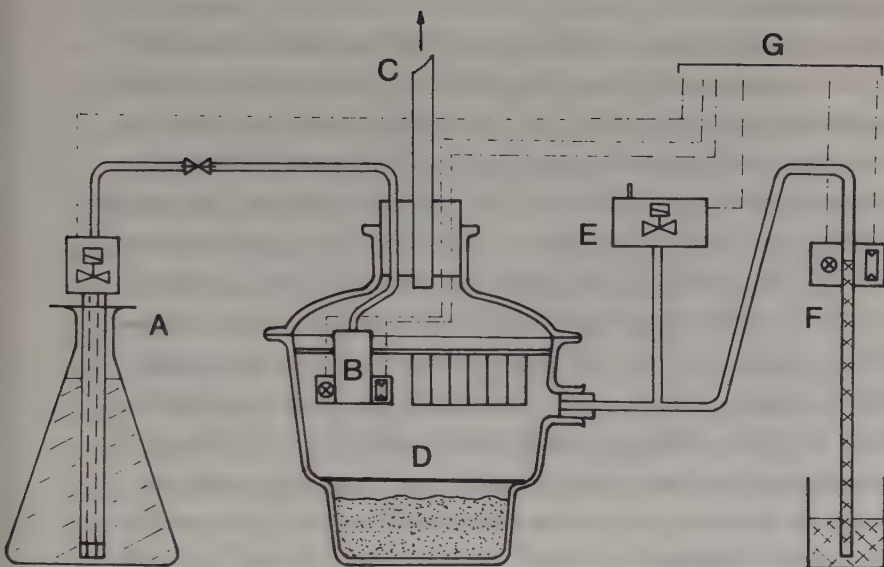


Abb. 1: Unterdruckkammer zur Hypoxiebehandlung der Mäuse:

- A = Trinkwassergefäß mit Magnetventil
- B = Lichtschraken-Schaltung zum Auslösen des Trinkwasserzuflusses
- C = Luftabsaugung durch Vakuumpumpe
- D = Aufenthaltsraum für Versuchstiere
- E = Magnetventil für Luftzustrom zur Kammer, gesteuert von F
- F = Quecksilber-Säule mit Fotowiderstands-Schalter zur Regulierung von Kammer-Unterdruck und Frischluftzufuhr
- G = Zuleitungen zur Stromversorgung und elektronischen Steuerung

zu 1. und 2.:

Eine Quecksilbersäule, welche mittels Schlauchverbindung direkt an die Kammer angeschlossen war, diente der Regulierung von Unterdruck und Frischluftzufuhr; das Quecksilber selbst war dabei zur Vermeidung von Verdunstung und Oxydation mit etwas dünnflüssigem klaren Öl überschichtet worden. Die jeweilige Höhe der Quecksilbersäule zeigte direkt die Differenz zwischen Außen- und Innendruck in mm Hg. Diese Druckdifferenz konnte mit Hilfe eines verschieblich auf der Säule angebrachten Fotozellenschalters fest eingestellt werden, d.h. bei ständig laufender Pumpe und zunehmender Evakuierung der Kammer wurde, sobald die Säule den eingestellten Punkt erreichte, über ein Magnetventil Außenluft in die Kammer eingelassen. Der damit bewirkte Abfall der Quecksilbersäule um wenige mm schaltete den Luftzustrom ab und führte zur Wiederholung des Einstellvorgangs.

Die mit Hilfe der Hg-Säule festgehaltene Druckdifferenz betrug konstant 400 mmHg; das bedeutete bei einem mittleren äußeren Luftdruck von 716 mmHg (München) einen mittleren absoluten Druck von ca. 320 mmHg in der Kammer und demnach einen mittleren O_2 -Partialdruck von etwa 65 mmHg. Bei der hier angewandten Art der Drucksteuerung wurden allerdings meteorologisch bedingte Luftdruckschwankungen in die Kammer übertragen, so daß mäßige Abweichungen nach oben oder unten möglich sind.

Der bei dieser Einstellung ständig nachfließende Frischluftstrom betrug, wie mehrere Messungen ergaben, ca. 1 l Außenluft/min, was bei einer zur Hälfte evakuierten 10-Liter-Kammer eine Umwälzung des Kammerinhalts in etwa 5 Minuten bedeutet.

zu 3.:

Zur Futterversorgung wurde einer der üblichen Gitter-Futterkörbe mit einem für mehrere Tage ausreichenden Vorrat an Altromin-Preß-

futter eingebaut. Für die Trinkwasserversorgung allerdings konnten die gebräuchlichen Kunststoffflaschen mit am unteren Ende angebrachter Trinköffnung nicht verwendet werden, weil sie sich durch die bei der Luftzufuhr auftretenden geringfügigen Druckschwankungen in der Kammer innerhalb weniger Stunden entleerten. Andere Wassergefäße im Innern der Kammer wurden entweder nicht benutzt oder verunreinigt. Als ideale Lösung ergab sich schließlich die Unterbringung des Wassers in einem Gefäß außerhalb der Kammer, von wo es, durch ein Magnetventil gesteuert, über eine dünne Schlauchverbindung in das Innere geleitet wurde. Die Tiere konnten, wenn sie trinken wollten, durch Unterbrechung eines Lichtstrahls das Magnetventil öffnen und das Wasser in der gewohnten Form an einer imitierten Trinkwasserflasche entnehmen.

Für sämtliche Hypoxieversuche wurden junge männliche NMRI-Mäuse benutzt, die beim Einbringen in die Kammer etwa 20 Gramm wogen. Der Innendruck wurde langsam über mehrere Stunden auf Sollwert gesenkt, um die intravasale Freisetzung gelöster Blutgase (Caisson-Krankheit) zu vermeiden. Die Tiere entwickelten während der Drucksenkung eine deutliche Zyanose und zeigten in den ersten folgenden Tagen nur wenig Aktivität. Die Hypoxiebehandlung wurde ununterbrochen über 10 Tage durchgeführt; eine kurzfristige Ausschleusung aus der Kammer zur Reinigung erfolgte nur alle 3 - 4 Tage.

Erfolg der Hypoxiemethode

- a) Hämatokrit: Die Tiere zeigten nach beendeter Prozedur erhöhte HK-Werte von durchschnittlich 60 % (normal 40 %).
- b) Die Erythroblasten im Knochenmark waren in der absoluten Zahl deutlich vermindert; die einzelnen Reifestufen zeigten eine

Umkehrung der üblichen Relationen. (Zahlenangaben bezogen auf je 100 kernhaltige Zellen):

	normal	Posthypoxie
Proerythroblasten	3	8
Basophile Erythroblasten	8	6
polychromatische Erythroblasten	18	2

- c) Die Fe-Inkorporation konnte auf Werte nahe 0 % gesenkt werden (normal: 20 - 40 %).

(Alle Ergebnisse zeigen die Verhältnisse 10 Tage nach Beendigung der Hypoxie. Einzelheiten werden bei den folgenden Versuchen beschrieben).

III. Inkorporation von markiertem Eisen (^{55}Fe , ^{59}Fe)

Der meistangewandte Standardversuch zur Beobachtung und Quantifizierung von ESF-Wirkungen ist die Messung der Menge radioaktiv markierten Eisens welche 24, 48 oder 72 Stunden nach Injektion von ESF in die polyglobule, erythropoetisch suppressierte Maus im peripheren Blut erscheint. Diese Messung ist einfach durchzuführen, wird aber von zahlreichen Parametern beeinflusst, die möglicherweise unabhängig voneinander und unterschiedlich auf ESF ansprechen:

- Größe, Verteilung und Verfügbarkeit vorhandener Fe-Vorräte, Verteilung und Mischung des markierten Fe in diesen vorhandenen Vorräten, Grad und Geschwindigkeit der Umwandlung in die Transportform (Transferrin)
- Hb-Synthesegeschwindigkeit der Einzelzelle und Gesamtzahl der Hb-synthetisierenden Zellen in Knochenmark und Peripherie; Zahl der proliferativen Zyklen im Erythroblastenkompartiment und

jeweilige Zyklusdauer; Reifungszeit der nicht-proliferierenden kernhaltigen Zellen, Reifungszeit der Retikulozyten bis zur Ausschüttung,

- c) nachträgliche Verminderung von bereits eingebautem Eisen durch Hämolyse oder ineffektive Erythropoese

Der bei allen Fe-Einbauversuchen gleichbleibende Schlußteil, nämlich Blutentnahme und Messung des inkorporierten Eisens, soll zuerst beschrieben werden; die je nach Versuchsaufbau unterschiedlichen vorausgehenden Injektionsschemata werden später bei den jeweiligen Anwendungsformen dargestellt.

1. Blutentnahme und -messung

Wir haben bei den folgenden Versuchen mit zwei Isotopen, ^{55}Fe und ^{59}Fe , gearbeitet; Aufarbeitung des Blutes und Meßmethoden unterscheiden sich zwangsläufig:

^{55}Fe : Die polycythämischen Mäuse erhielten 24 oder 48 Stunden nach ip-Injektion von 0,5 μC ^{55}Fe je 10 Einheiten Heparin sc. und wurden 20 Minuten später gewogen, in Äther narkotisiert und durch Eröffnung von Halsvenen entblutet. Vom Blut jeder Maus wurden 0,5 ml abpipettiert und der Rest zur Hämatokritbestimmung verwendet. Die abpipettierte Menge konnte durch Zumischen von 0,5 ml Perchlorsäure (60-%ig, Merck) und 1 ml Perhydrol (30 Gew.-% H_2O_2 , Merck) und damit Oxydation des Hämoglobins in eine klar-gelbliche Lösung übergeführt werden, welche noch zahlreiche weiße Flöckchen enthielt. Diese wurden mit kleinen, eigens zugeschnittenen Papierfiltern, welche wenig Flüssigkeit zurückhielten, abfiltriert. 1 ml der klaren Lösung konnte somit gewonnen und nach Zusatz von 8 ml Äthylenglykolmonoäthyläther (Lösungsvermittler) und 10 ml Szintillationsflüssigkeit (6 g PPO in 1 l Toluol) im Scintillationszähler

(Packard Tri carb, Mod. 578) gemessen werden. Die Meßzeit pro Röhrchen betrug jeweils 10 Minuten; alle Zählungen wurden mehrmals wiederholt. Ein ^{55}Fe -Standard von 0,5 μC - entsprechend der pro Maus injizierten Aktivität - wurde einer vergleichbar aufbereiteten, aber inaktiven Blutprobe beigemischt und bei allen Meßdurchgängen mitgezählt.

Alle Meßergebnisse wurden bei der Auswertung auf die Gesamtblutmenge des Tieres umgerechnet und - wie in der Literatur allgemein üblich - als Prozentsatz der insgesamt injizierten Aktivität angegeben. Dabei wurde die Gesamtblutmenge mit 7,5 % des Körpergewichts angenommen (42, 97). Die pro Maus entnommenen 0,5 ml Blut wurden etwas vereinfachend als 0,5 g eingesetzt, wobei der Flüssigkeitsverlust bei der Filtration selbstverständlich berücksichtigt wurde.

$$100 \times \frac{\frac{\text{KG} \times 0.075}{0,5} \times \text{cpm (Blut)}}{\text{cpm (0,5 } \mu\text{C)}} = \text{Fe-Einbau in \%}$$

Die geringfügigen rechnerischen Vereinfachungen können angesichts der viel größeren biologischen Streuungen vernachlässigt werden.

^{59}Fe : Blutentnahme nach 0,5 μC ^{59}Fe wie bei ^{55}Fe ; daran anschließend Hämolyse der entnommenen 0,5 ml in 4 ml aqua dest. und - nach Umfüllen in spezielle Zählröhrchen - direkte Zählung der Lösung in einem Gamma-Zählgerät (Picker, spectro scaler III A). Die Meßzeit betrug in der Regel 1 Minute, bei niedrigen Meßwerten auch 3 Minuten. Die Berechnung erfolgte wie oben beschrieben. Der Vorteil beim ^{59}Fe -Verfahren besteht darin, daß effektiv die gesamte im gesammelten Blut eingebaute Aktivität direkt erfaßt wird, während bei ^{55}Fe durch die zwischengeschaltete oxydative Aufarbeitung und Filtration Aktivität in nicht kontrollierbarer Weise verloren geht.

2. Anwendung der Methode zur Prüfung der Suppression nach Hypoxie- behandlung

Da aus der Literatur bekannt ist, daß Grad und Zeitverlauf der Erythropoesesuppression nach Beendigung der Hypoxie wesentlich von den individuellen Versuchsbedingungen und vom verwendeten Mäusestamm abhängen, wurde an einer Serie von 12 Mäusen der Verlauf der Erythropoese nach der gemeinsamen Hypoxiebehandlung verfolgt: Als Isotop wurde ^{55}Fe verwendet (Eisenchlorid in 0,1 M HCl, 1 - 10 mC/mg, Radiochemical Centre Amersham) und zur Injektion mit 0,9-%iger NaCl-Lösung verdünnt:

Versuchs- bezeichnung	Gewicht (g)	Fe-55, 0,5 ml in 1 ml ip (Tage nach Be- endigung der Hypoxie	Blutentnahme 24 Std. nach ^{55}Fe	
			Hämatokrit %	^{55}Fe -Inkorporation in % der inj. Akt. (Mittelwert aus 2 Mäusen)
1 a	27,6	1. Tag	60	14,4 %
1 b	29,7		58	
3 a	27,8	3. Tag	58	3,1 %
3 b	28,2		57	
5 a	29,9	5. Tag	54	3,5 %
5 b	28,9		59	
7 a	34,1	7. Tag	40 ^{*)}	0,25 %
7 b	31,1		56	
9 a	29,8	9. Tag	53	0,28 %
9 b	32,3		55	
11 a	33,2	11. Tag	55	0,87 %
11 b	39,0		55	

^{*)} HK-Werte unter 50 % wurden nicht zur Messung verwendet

Bei diesem Versuch sind weniger die absoluten Einbauwerte interessant, sondern vielmehr der zeitliche Verlauf: Es zeigt sich eine deutliche Suppression der Fe-Inkorporation zwischen dem 7. und 11. Tag nach Beendigung der Hypoxie. Dieser Zeitverlauf stimmt etwa mit den Erfahrungswerten aus der Literatur überein (119). Innerhalb des Zeitraums der maximalen Erythropoesesuppression also etwa zwischen dem 8. und 10. Tag wurden in den folgenden Versuchen die ESF-Wirkungen auf Fe-Einbau und Thymidin-Inkorporation gemessen.

3. Anwendung zur Testung der eigenen ESF-Präparate

Die von uns aus Patientenurin gewonnenen ESF-Präparate wurden mit Hilfe der Fe-Einbaumethode quantifiziert. Als Vergleichsmaßstab verwendeten wir ein ebenfalls pulverförmiges ESF-Präparat aus menschlichem Urin, welches in Internationalen Einheiten geeicht (IU in 1,48 mg) und von der WHO, International Laboratory for Biological Standards, National Institute for Medical Research, Mill Hill, London, N.W. 7, zur Verfügung gestellt worden war. Die Versuche dienten vor allem der Auswahl eines aktiven ESF-Präparates und eines inaktiven, aber nach gleicher Methode hergestellten Präparates von Urinproteinen, welche in den nachfolgenden Versuchen der DNS-Synthese-Bestimmung benötigt wurden. Als Isotope kamen ^{55}Fe (wie oben) und ^{59}Fe (Eisenchlorid in 0,1M HCl, 3 - 30 mC/mg, Radiochemical Centre Amersham) zur Anwendung:

Beendigung der Hypoxiebehand- lung	Injektion des Stan- dard- oder eigener ESF-Präparate (Lösung in 1 ml aqua dest. ip) aufgeteilt in 2 Hälften	Inj. von ^{59}Fe (0,5 uC in NaCl 1 ml ip)	Blutentnahme und Messung des Fe-Einbaus
Tag 0	6. und 7. Tag	8. Tag	10. Tag

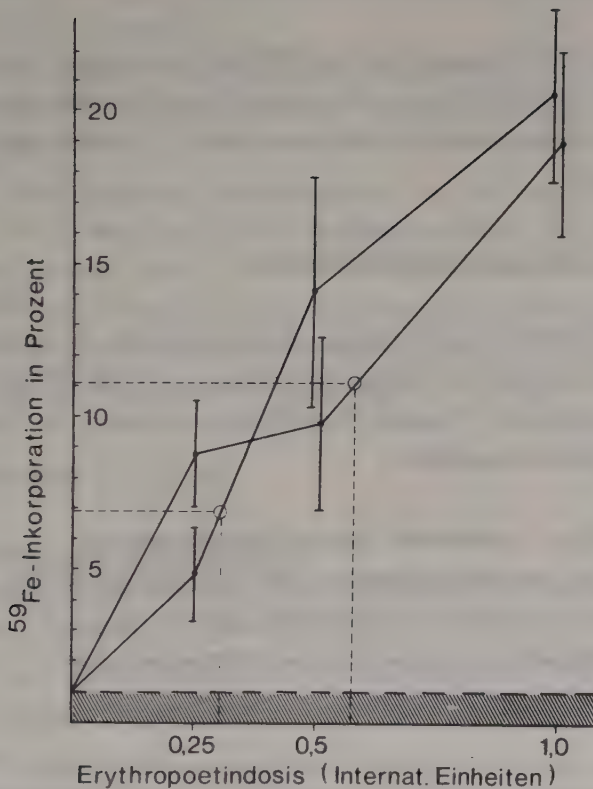


Abb. 2: Eichung der hergestellten Urin-ESF-Präparate anhand von Referenzpräparaten mit der Fe-Einbau-Methode: Die beiden Eichkurven wurden in zwei unabhängigen Versuchen gewonnen; jeder Punkt zeigt den Mittelwert von mindestens 4 Tieren. Die Kreise markieren die Fe-Einbauwerten nach 5 bzw. 10 mg des aktiven Urinpräparates (Standardfehler 28 bzw. 20 %). Im Bereich der schraffierten Fläche liegen die Einbauwerten nach inaktivem Urinpräparat oder NaCl.

IV. Bestimmung der DNS-Synthesegeschwindigkeit

Der Einfluß der ESF-Präparate auf die DNS-Syntheserate in Erythroblasten wurde schließlich unter Verwendung der polycythämischen Mäuse durch autoradiographische Bestimmung der ^{14}C -Thymidinenbaurrate untersucht.

1. Auswahl des ESF- und Kontrollpräparates

Bei sämtlichen Arbeiten mit Erythropoetin besteht das im Grunde nicht lösbare Problem, mit welchem Kontrollwert der ESF-Effekt verglichen werden soll. Folgende Möglichkeiten werden in der Literatur am häufigsten angewendet:

a) Vergleichstiere, unbehandelt oder mit NaCl-Injektion.

Nachteil: Die komplexe Zusammensetzung der aktiven ESF-Präparate und ihre vermutlich zahlreichen spezifisch erythropoesebezogenen und unspezifischen Nebeneffekte gehen nicht in den Kontrollwert ein.

b) Vergleichstiere mit Injektion eines enzymatisch (Trypsin, Neuraminidase) deaktivierten ESF-Präparates.

Nachteil: Die obenerwähnten Nebeneffekte werden vermutlich unkontrollierbar verändert.

c) Vergleichstiere mit Injektion eines hinsichtlich der Gewinnungsmethode gleichartigen, aber von vornherein erythropoetisch inaktiven Proteinpräparates.

Nachteil: Das Kontrollpräparat stammt von anderen Individuen und unterscheidet sich hinsichtlich Zusammensetzung und Nebenwirkungen vermutlich vom Testpräparat.

Wir haben anhand der Fe-Einbau-Methode 2 Präparate für die folgenden Versuche ausgewählt:

- a) ein Testpräparat mit deutlicher Aktivität (ca. 0,6 IU in 10 mg) vom Urin einer Patientin (H. K., 55 Jahre) mit aplastischer Anämie,
- b) ein Kontrollpräparat ohne Aktivität vom Urin mehrerer Patienten der Kinderklinik, deren Krankengeschichten im einzelnen nicht bekannt waren

Beide Präparate waren auf die gleiche Art hergestellt worden (Abschnitt I) wobei Präparat b) offenbar kein ESF, oder kein ESF in aktiver oder aktivierbarer Form enthielt.

2. Inkubation mit ^{14}C -TdR

a) Theoretische Voraussetzungen

Die Inkubationsmethode wurde ursprünglich von W. Brinkmann und Mitarbeitern am Modell des Rattenknochenmarks entwickelt; Einzelheiten hierzu sind in den entsprechenden Originalarbeiten beschrieben (14, 15, 16). An dieser Stelle soll nur das Prinzip der Methode kurz dargelegt werden:

Knochenmark aus Femus und Tibia wird in Form von Zellsuspensionen in Inkubationsröhrchen gefüllt und in einem Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Zu Beginn der Inkubation wird ^{14}C - oder ^3H -Thymidin zugesetzt. Entscheidend ist außerdem ein Zusatz von Amethopterin, welcher die de novo-Synthese von Thymidinmonophosphat in der Zelle blockiert. Unter diesen Bedingungen kann davon ausgegangen werden, daß nach etwa 12 Minuten Inkubationsdauer in der Zelle der endogene Pool von Thymidin-Monophosphat erschöpft ist, so daß nur noch exogenes aktives TdR in die DNS eingebaut wird. Am Rattenknochenmark kann gezeigt werden, daß der Einbauzuwachs von ^{14}C -TdR in Erythroblasten zwischen 12 und 20 Minuten Inkubationsdauer linear und offenbar ohne Hemmung der DNS-Synthese verläuft und

daß dabei nur markiertes TdR in die DNS eingebaut wird (14, 16).

Demnach kann nach Aufteilung der zu prüfenden Knochenmarksprobe in 2 Hälften je ein Einbauwert für 12 und 20 Minuten Inkubationsdauer mittels quantitativer Autoradiographie bestimmt werden; die Differenz zwischen beiden ergibt ein absolutes Maß für die pro Zeiteinheit eingebaute Thymidinmenge und - bei wirksamer Amethopterinblockade - für die DNS-Synthesegeschwindigkeit.

b) Modifizierung der theoretischen Voraussetzungen

Für die eigenen Versuche mußte nachgeprüft werden, ob das beschriebene Modell vorbehaltlos auf Mäuseknochenmark angewandt werden konnte. Es zeigte sich, daß der Einbauzuwachs an ¹⁴C-TdR zwischen 12 und 20 Minuten, zumindest bei einigen Inkubationen, abfallende Tendenz zeigte.

In zahlreichen Vorversuchen mit unterschiedlichen Mäusestämmen, ¹⁴C-TdR- und Amethopterinkonzentrationen konnte dieses Phänomen nicht beseitigt werden. Es handelt sich offenbar um eine zunehmende Hemmung der DNS-Synthese mit fortschreitender Inkubationsdauer, möglicherweise bedingt durch zusätzliche hemmende Stoffwechseleffekte des Amethopterin, zunehmenden Mangel an Vorläufern der DNS-Synthese, an Transportmechanismen, Enzymen oder Energieträgern (ATP).

Die Differenz zwischen 12- und 20-Minuten-Einbau konnte unter diesen Voraussetzungen nicht als Grundlage zur Bestimmung der absoluten DNS-Synthesegeschwindigkeit herangezogen werden. Wir haben deshalb für die weiteren Versuche den Anspruch einer streng quantitativen Messung der DNS-Synthesegeschwindigkeit aufgegeben und die Wirkung der ESF-Präparate durch vergleichende Messungen dargestellt. Dabei wurde die ursprüngliche Inkubationstechnik beibehalten, die jeweiligen 12- und 20-Minuten-Einbauwerte jedoch als getrennte Einzelergebnisse innerhalb der interessierenden Vergleichsgruppen

gegenübergestellt. Da sämtliche Zellen innerhalb der 12- und 20-Minuten-Gruppen völlig gleich behandelt wurden, kann man die Voraussetzungen für eine Vergleichsmessung als gegeben ansehen.

c) Anwendung zur Messung der ESF-Wirkung

aa) Vorbehandlung der Tiere

Obwohl bisher noch keine Veränderung der DNS-Syntesegeschwindigkeit an supprimierten polyglobulen Tieren nachgewiesen wurde, haben wir für alle Versuche posthypoxische polyglobule Mäuse verwendet. Dies geschah - wie bei allen Testungen von ESF-Wirkungen - in der Annahme, daß ein möglicher Effekt auf die DNS-Synthese nach Senkung des normalen Erythropoetinspiegels am deutlichsten in Erscheinung treten müsse.

Jeweils 16 Tiere aus einer Hypoxiebehandlung wurden 10 Tage nach Beendigung der Behandlung innerhalb weniger Stunden getötet und für die Knochenmarksinkubation vorbereitet. Die Tiere hatten vorher nach folgendem Schema ESF- und Kontrollpräparate erhalten:

Zeitplan	Injektionen
16 Std. vor Inkub.	2 Tiere je 10 mg aktives Präp. in 1 ml a. d. ip 2 Tiere je 10 mg inakt. Präp. in 1 ml a. d. ip
8 Std. vor Inkub.	w. o.
4 Std. vor Inkub.	w. o.
Tötung und Inkub. (10 Tage nach Be- endigung d. Hypoxie)	2 x 2 Tiere ohne Injektion als unbehandelte Kontrolltiere

bb) Durchführung der Inkubation

Jeweils 2 gleichbehandelte Mäuse (s.o.) wurden zusammen in Äther getötet und ihr Knochenmark durch Ausspülen der 4 Femurknochen mittels Injektionsspritzen in einem Gläschen mit gekühltem Medium 199 gesammelt. Nach mehrmaligem vorsichtigen Filtrieren durch ein Glasfilter (Porengröße 40 - 90 μ) konnte eine homogene Zellsuspension hergestellt werden. Das Volumen der Gesamtsuspension wurde durch Abzentrifugieren der Zellen in der Kühlzentrifuge bei 0° C, Absaugen der Überstandes und Resuspension in Medium 199 so verkleinert, daß die gesamten Zellen in 2 Inkubationsröhrchen mit je 0,95 ml Inhalt aufgeteilt werden konnten. Vor dem Aufteilen wurden der Gesamtsuspension noch verschiedene Zusätze (5×10^{-5} M/l Adenosin, 10^{-5} M/l Desoxycytidin, 250 mg/l Glycin, 300 mg/l Serin) und $1,3 \times 10^{-4}$ M/l Amethopterin zugegeben (alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Endkonzentration in der inkubationsfertigen Suspension). Die aufgeteilten 2 gleichartigen Zellsuspensionen wurden nach Zusatz von ^{14}C -TdR (Endkonz. 10^{-5} M/l, spez. Akt. 59 mC/mM) nach einem vorher festgesetzten Zeitschema im Schüttelwasserbad bei 37° C inkubiert; und zwar ein Röhrchen 12 und ein Röhrchen 20 Minuten lang. Die Beendigung der Inkubation erfolgte durch Einbringen der Röhrchen in Eis, wodurch der TdR-Einbau abgebrochen wurde. Von den beiden Röhrchen wurden anschließend autoradiographische Ausstriche angefertigt; hierzu wurden die nach Abkühlen und Abzentrifugieren gewonnenen Zellen in einem Tropfen Kälberserum resuspendiert, mit sauberen Pinseln mäanderförmig auf vorgereinigte Objektträger ausgestrichen und anschließend 20 Minuten in Methanol fixiert. Von der 12- und 20-Min.-Inkubation wurden je 3 Präparate angefertigt.

Auf die beschriebene Weise wurden sämtliche 16 Tiere paarweise im Laufe eines Nachmittags getötet und inkubiert, wobei zwischen Tötung und Inkubation maximal ein Zeitraum von 1/2 Stunde lag. Diese

Aufarbeitung von 16 Tieren wird im folgenden als ein "Versuch" bezeichnet; 3 solcher Versuche wurden insgesamt durchgeführt.

3. Quantitative ^{14}C -Autoradiographie

Die Auswertung der autoradiographischen Präparate erfolgte nach dem Prinzip der quantitativen Autoradiographie am Mikroskop-Auflichtphotometer. Die Methode bietet gegenüber der konventionellen Silberkornzählung entscheidende Vorteile:

- a) Die vielfach schnellere Messung der Einzelzelle gestattet die Auswertung großer Zellzahlen und verbessert wesentlich die statistische Sicherheit.
- b) Durch Verwendung von Radioaktivitätsstandards kann die absolute Menge an TdR, die pro Zelle eingebaut wurde, berechnet werden.

Die komplexen physikalischen, photochemischen und mathematischen Grundlagen dieser von P. Dörmer und Mitarbeitern entwickelten Methode gehen über den Rahmen dieser Arbeit hinaus; sie sind in Fachliteratur und Originalarbeiten ausführlich beschrieben (25, 26, 27). Im folgenden wird deshalb nur das Prinzip der Methode - soweit im Zusammenhang mit den eigenen Messungen notwendig - erläutert.

a) Vorbereitung der Präparate

Die nach der Inkubation hergestellten Ausstrichpräparate wurden mit Kodak-AR-10-stripping-Film überzogen und in licht- und feuchtigkeitsdichten Behältern bei 4°C exponiert. Die Expositionszeit betrug je nach Inkubationsdauer 15 bis 27 Tage.

Die Präparate wurden dann entwickelt, fixiert, gewässert und getrocknet. Im Anschluß daran erfolgte eine Giemsa-Färbung und Differenzierung der Färbung mit einem gekühlten Gemisch aus 30 %

Äthanol und 70 % Phosphatpuffer (pH 6,4). Dieser wichtige Schritt der Differenzierung soll die bei der Auflichtphotometrie als Background störende Färbung des Films möglichst entfernen, die Färbung der Zellen selbst aber nur soweit reduzieren, daß eine morphologische Klassifizierung noch möglich ist. Dieser kritische Punkt ist optimal nur durch häufige Beobachtung des Präparates im Mikroskop während des Differenzierungsvorgangs erreichbar.

b) Auswahl der Zellklassen

Es wurden 3 Klassen der Erythroblastenreihe gemessen: Proerythroblasten, Basophile- und Polychromatische Erythroblasten. Die morphologische Klassifizierung war wegen der vorausgegangenen partiellen Entfärbung und der Überlagerung mit Silberkörnern nicht immer einfach; so konnten beispielsweise Charakteristika wie Chromatinstruktur und Nukleolen nur selten zur Differenzierung herangezogen werden. Als Leitmerkmale der erythropoetischen Zellreihe dienten

- die runde Zellform (soweit nicht durch Artefakte verändert)
- das deutlich basophile Zytoplasma

Die Gliederung innerhalb der Erythroblasten erfolgte etwa nach folgenden Größenklassen:

Proerythroblasten	20 - 13 μ
Basophile Erythroblasten	12 - 8 μ
Polychromatische Erythroblasten	7 - 5 μ

Die genannten Größenklassen konnten mit Hilfe eines Okularmikrometers relativ gut unterschieden werden.

c) Durchführung der Messungen

Die Arbeitsvorgänge am Photometer-Mikroskop lassen sich etwa folgendermaßen gliedern:

aa) Aufsuchen und Einstellen der Zelle im Durchlicht, d.h. die Zelle wird morphologisch klassifiziert und dann in die Mitte einer ins Blickfeld eingespiegelten Meßblende zentriert. Die Meßblendenfläche wird dabei etwas größer als die Kernfläche eingestellt; die Meßblendenfläche begrenzt die Zahl der im nächsten Schritt gemessenen Silberkörner.

bb) Messen der Silberkornzahl im Auflicht: Nach Abschalten des Durchlichts wird ein von einer Quecksilberdampfampe ausgehender Lichtstrahl mit definierter Wellenlänge (436 nm) von oben durch das Objektiv auf die eingestellten Silberkörner gelenkt; der von diesen remittierte Bruchteil des Lichts kann, wiederum nach Durchgang durch das Objektiv, mittels Fotomultiplier verstärkt und in einer nachgeschalteten elektronischen Einheit als digitaler Zahlenwert ausgegeben werden. Die Ausgabe kann erfolgen

- als optische Anzeige
- als Ausdruck auf Protokollstreifen
- als codierte Lochung in Lochstreifen

Der Meßwert ist innerhalb gewisser Grenzen - unter Voraussetzung standardisierter Meß- und Expositionsbedingungen - der pro Zelle inkorporierten ¹⁴C-Aktivität proportional. Diese Bedingungen werden durch folgende

dd) Standardmessungen erreicht:

aaa) Externer Standard

Ein metallischer Reflektor mit definierten Reflexionseigenschaften, welcher in regelmäßigen Abständen zwischen den Präparaten gemessen wird, ermöglicht die Erkennung und laufende Korrektur von technisch

bedingten Schwankungen in der Meßeinrichtung, wie beispielsweise Intensität des Auflichts, Empfindlichkeit des Photomultipliers, Effizienz der Verstärkerelektronik u. ä.

bbb) Interner Standard

Die Silberkorndichte eines Aktivitätsstandards mit bekannter Referenzaktivität (Plättchen aus ^{14}C -Polymethylmethacrylat, $5 \times 5 \times 1$ mm, $1,092 \mu\text{C}/\text{cm}^3$) welcher auf jedem Objektträger befestigt und zusammen mit den Zellausstrichen unter dem gleichen Film exponiert worden war, wird bei jedem Autoradiogramm mitgemessen. Er ermöglicht

- Erkennung und Korrektur von Schwankungen in den Expositionsbedingungen (Expositionszeit, Filmdicke, Filmempfindlichkeit, Background u. ä.)
- Bestimmung der absoluten pro Zelle inkorporierten Thymidinmenge (Mol/Zelle) durch Erstellen einer rechnerischen Beziehung zwischen der Silberkorndichte über der bekannten Referenzaktivität einerseits und der Silberkorndichte über der unbekannten Zellaktivität andererseits.

Auf die beschriebene Weise wurden von jeder Zellart pro Versuch durchschnittlich 50 Zellen gemessen; ebenso wurden zu jedem Präparat auch Backgroundmessungen über vergleichbaren aber unmarkierten Zellen durchgeführt.

d) Berechnung der Ergebnisse

Sämtliche auf Lochstreifen gesammelten Zell- und Standardmessungen wurden im Rechenzentrum der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München-Neuherberg auf einer ICL-Anlage 1902 A nach fertigen Programmen weiterverarbeitet. Die Rechenschritte des

Computerprogramms lassen sich etwa in folgende logische Vorgänge gliedern:

aa) Berechnung der biologischen ^{14}C -TdR-Einbauwerte (Mol pro Zelle) aus den über Lochstreifen eingegebenen Meßwerten und anderen, mittels Lochkarten eingegebenen fixen technischen Größen.

bb) Zusammenfassung der gemessenen Einzel-Einbauwerte zu Mittelwerten (arithmetisches, harmonisches, geometrisches Mittel)

cc) Erstellung von Häufigkeitsverteilungen der gemessenen Einbauwerte und deren Umverteilung zur Erzielung einer wichtungsfreien Verteilung:

Erläuterung:

Bei Erstellung einer statistischen Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der gemessenen Einbauwerte (Merkmalsklasse: DNS-Synthesegeschwindigkeit V) ist zu berücksichtigen, daß die Merkmalsklasse selber einen Einfluß auf die Häufigkeit hat. Dies ergibt sich einfach aus der biologischen Überlegung, daß die Gesamtzahl der in einem homogenen Kompartiment zu einem bestimmten Zeitpunkt angetroffenen Zellen dem Produkt aus

$$n = E \times L$$

entspricht (E = Einstrom ins Kompartiment $[n/t]$, L = Lebensdauer oder Aufenthaltsdauer im Kompartiment).

Das bedeutet z.B. für das jeweils gemessene Kompartiment der DNS-Synthese, daß die schnell synthetisierenden Zellen aufgrund ihrer kurzen Aufenthaltszeit unterrepräsentiert sind, und zwar um den Faktor $1/V$. Das Umgekehrte gilt sinngemäß für die langsam syntheti-

sierenden Zellen. D.h. die gemessenen Häufigkeitsverteilungen sind verzerrt durch Wichtung der individuellen Besetzungszahl n_i mit dem Reziprokwert der Synthesegeschwindigkeit $1/V_i$ (linksgipflige Häufigkeitskurve). Die zugehörigen arithmetischen Mittel sind gleichsinnig verfälscht.

Durch entsprechende Gegenwichtung ergibt sich dann das korrekte wichtungsfreie Mittel nach

$$\text{dd) } v_s = \frac{\sum V_i \times n_i \times V_i}{\sum n_i \times V_i} = \frac{\sum V_i^2}{\sum V_i} \quad [\text{Mol} \times 10^{-18} \text{ pro Zelle}]$$

Sämtliche genannten Rechenoperationen wurden getrennt nach Versuchen, Inkubationszeiten und Zellklassen für jeden Typ der Vorbehandlung (Vergleichsgruppe)

- unbehandeltes Kontrolltier
- inaktives Präparat)
- ESF-Präparat) jeweils 4, 8, 16 Stunden vor Inkubation

einzelnen durchgeführt.

Das folgende Ergebnisprotokoll zeigt die Gliederung der Meßergebnisse (wichtungsfreie Mittel) innerhalb eines Versuches.

Tab. 2: Darstellung der absoluten Meßgrößen in einem typischen Versuchsablauf (n = Zahl der bei jeder Inkubation ausgewerteten Zellen, $\bar{x}$ = daraus gewonnenes wichtungsfreies Mittel des 14 C-TdR-Einbaus [Mol $\times 10^{-18}$]

s = Standardabweichung)

		unbehandelte Kontroll- tiere		4 Stunden nach inakt. akt. Präparat		8 Stunden nach inakt. akt. Präparat		16 Stunden nach inakt. akt. Präparat	
<u>12-Minuten- Inkubation:</u>									
Pro-	n	49	35	49	50	29	55	65	45
erythroblasten	$\bar{x}$	180,4	178,1	155,6	168,9	171,2	209,1	146,8	156,3
	s	40,5	38,7	41,7	47,7	39,7	35,0	32,9	36,2
Basophile	n	52	32	52	49	26	52	51	51
Erythroblasten	$\bar{x}$	147,3	148,7	153,9	167,7	152,3	193,7	105,5	145,9
	s	37,8	33,8	43,3	38,0	35,2	33,4	20,2	33,1
Polychromatische	n	48	36	21	49	24	50	46	48
Erythroblasten	$\bar{x}$	127,6	86,6	81,9	139,0	112,4	144,4	100,6	124,9
	s	29,9	34,4	30,7	39,2	28,9	41,4	30,5	28,8
<u>20-Minuten- Inkubation:</u>									
Pro-	n	59	50	51	47	41	58	55	56
erythroblasten	$\bar{x}$	274,0	264,0	211,8	241,3	201,3	271,0	206,3	232,7
	s	83,3	62,2	69,1	65,5	48,0	50,2	50,0	65,8
Basophile	n	52	47	50	51	52	52	48	56
Erythroblasten	$\bar{x}$	224,0	228,4	190,5	220,1	176,1	278,0	175,2	202,5
	s	46,9	55,7	43,8	68,9	42,7	48,7	33,5	38,2
Polychromatische	n	50	60	54	54	40	51	33	57
Erythroblasten	$\bar{x}$	207,5	150,6	144,4	177,1	169,5	234,1	149,0	191,0
	s	55,3	64,6	50,2	55,5	49,7	53,6	48,1	51,2

D. ERGEBNISSE

Die im folgenden benutzten vereinfachenden Begriffe "Wert", "Meßwerte" oder "Einbau (-werte)" beziehen sich immer - wenn nicht ausdrücklich anders angegeben - auf die im vorhergehenden Abschnitt d), dd) beschriebenen und in den Ergebnistabellen zusammengefaßten wichtungsfreien Mittel der unterschiedlich vorbehandelten Vergleichsgruppen. Diese Werte wurden auch den folgenden graphischen Darstellungen zugrunde gelegt:

Abb. 3 gibt einen Überblick über den ^{14}C -TdR-Einbau in jedem der 3 Versuche. Alle Werte, sowohl des aktiven als auch des inaktiven Präparates sind in Prozent der jeweils unbehandelten Kontrolltiere dargestellt. Wichtige bzw. signifikante Einbauunterschiede gehen aus Abb. 4 hervor.

1. Meßwerte nach Gabe des aktiven ESF-Präparates

a) Vergleich mit inaktivem Kontrollpräparat

Die ESF-Werte sind in fast allen Versuchen und Zellklassen deutlich höher, als die jeweils zugehörigen mit vorausgegangener Kontrollbehandlung (inaktives Proteinpräparat). Um signifikante Unterschiede herauszufinden wurde folgende Bedingung gestellt:

Die Differenz zwischen Einbauwert ESF und Einbauwert Inakt. mußte innerhalb einer Zellklasse in allen Versuchen und allen Inkubationen gleichsinnig ($\text{ESF} > \text{Inakt.}$) und signifikant sein ($p < 0,05$). Diese Bedingung erfüllten nur die Werte 8 Stunden nach Präparatgabe und zwar für alle Zellklassen. Der Mehreinbau in dieser Gruppe beträgt nach Abb. 4:

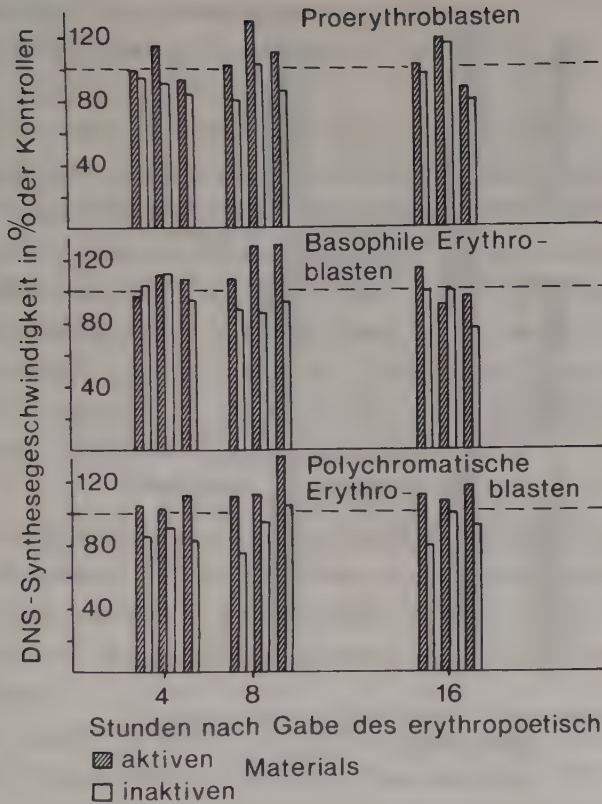


Abb. 3: Darstellung des ^{14}C -TdR-Einbaus in allen 3 Versuchen:
Jede Säule repräsentiert den Mittelwert aus 2 gleichzeitig ausgeführten Inkubationen (= 1 Versuch); entsprechend 70 - 100 ausgewerteten Zellen. Alle Einbauwerte sind auf die Werte der unbehandelten Kontrolltiere (= 100 %) bezogen.

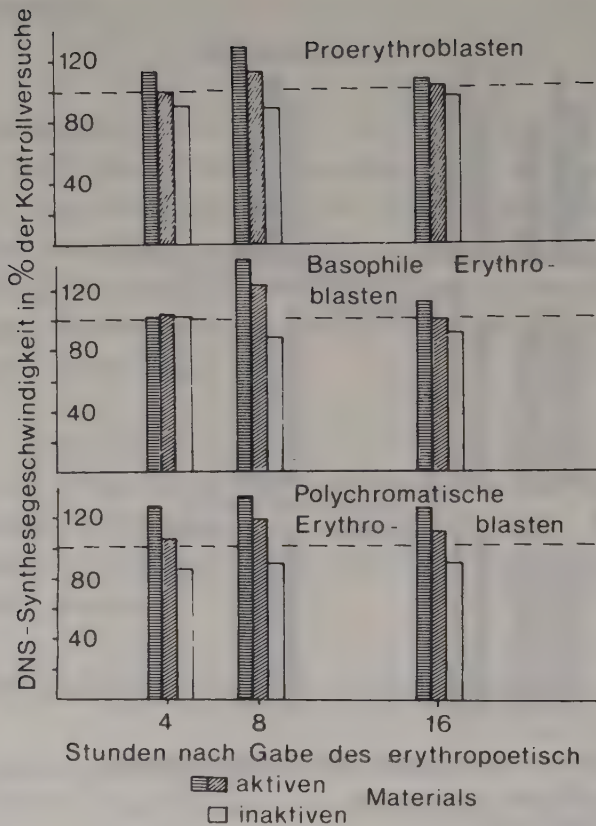


Abb. 4: Überblick über die wesentlichen ^{14}C -TdR-Einbauunterschiede nach unterschiedlicher Vorbehandlung bzw. unterschiedlicher Zeitspanne zwischen Präparatgabe und Messung: Jede Säule repräsentiert den Mittelwert aus insgesamt 6 Inkubationen (= 3 Versuche); entsprechend 200 - 300 ausgewerteten Zellen. Der Standardfehler beträgt max. 16 % einer Säule. Erläuterung:  = Einbau nach aktivem Präparat im Vergleich zum inaktiven Kontrollpräparat (= 100 %),  = Einbau nach aktivem Präparat im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (= 100 %),  = Einbau nach inaktivem Kontrollpräparat im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (= 100 %)

- Proerythroblasten	27 %
- Basophile Erythroblasten	39 %
- Polychromatische Erythroblasten	33 %

Die Differenzen ESF-Wert minus Kontrollwert 4 bzw. 16 Stunden nach ESF sind nicht in der oben geforderten Weise signifikant. Zwar finden sich auch in diesen Zeitgruppen innerhalb jeder einzelnen Zellklasse einige Inkubationen mit deutlichen Differenzen, aber auch solche mit nicht signifikanten Unterschieden, wie beispielsweise $p > 0,8$ in der 4-Stunden-Gruppe oder $p > 0,5$ in der 16-Stunden-Gruppe. Die ESF-Werte in beiden Gruppen wurden deshalb als insgesamt von den Kontrollwerten nicht signifikant verschieden eingestuft.

b) Vergleich mit unbehandelten polyglobulenen Kontrolltieren

Die ESF-Meßwerte sind gegenüber den Werten der unbehandelten Kontrolltiere nur relativ gering erhöht. Um unter diesen Umständen signifikante Unterschiede aufzudecken, wurde folgendermaßen vorgegangen:

Getrennt nach 4-, 8- und 16-Stunden-Vorbehandlung und Zellklassen wurden alle wichtungskorrigierten Einzelmessungen "ESF" aus 3 Versuchen zu einer Vergleichsgruppe zusammengefaßt und mit der entsprechenden Vergleichsgruppe "Kontrolltier" - nach vorheriger Prüfung beider Gruppen auf Normalität - mittels t-Test verglichen. Auch hierbei fiel auf, daß nur die 8-Stunden-Gruppe in allen Zellklassen positive (ESF-Wert minus Kontrollwert) und signifikante Differenzen ($p < 0,01$) aufwies:

- Proerythroblasten	10 %
- Basophile Erythroblasten	22 %
- Polychromatische Erythroblasten	15 %

2. Meßwerte nach Gabe des Kontrollpräparates

Aus Abb. 3 und 4 ergibt sich die Vermutung, daß die nach Kontrollpräparat gefundenen Meßwerte systematisch niedriger sind, als die der unbehandelten Kontrolltiere. Diese Verminderung ist relativ gering und folgt offenbar - anders als der oben beschriebene Mehreinbau nach ESF - keinem bestimmten typischen Zeitverlauf (Abb. 3). Zur Prüfung auf Signifikanz wurde analog zum eben beschriebenen Verfahren (1 b) die Gesamtheit der Einzelmessungen "Kontrollpräparat" über 4, 8 und 16 Stunden aus 3 Versuchen zusammengefaßt und den entsprechenden Einzelmessungen "Unbehandelte Kontrolltiere" getrennt nach Zellklassen gegenüber gestellt. Es ergab sich ein bei allen Zellklassen signifikanter Mindereinbau ($p < 0,01$) von 8 - 16 Prozent gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren.

E. DISKUSSION

I. Interpretation der Meßergebnisse

1. Nachweis einer gesteigerten DNS-Synthesegeschwindigkeit in einzelnen Erythroblasten

Unter den genannten Versuchsbedingungen bedeuten die erhöhten Mittelwerte, daß die durchschnittliche DNS-Synthesegeschwindigkeit der gemessenen Einzelzellen nach ESF angestiegen ist. Diese Mittelwerterhöhung sagt jedoch nichts über die tatsächliche Verteilung der Synthesesteigerung innerhalb der gemessenen Population aus. Grundsätzlich kann jeder der folgenden Mechanismen für die höheren Mittelwerte verantwortlich sein:

- a) Zur ursprünglich vorhandenen normal proliferierenden Gesamtpopulation kommt nach ESF eine schneller synthetisierende Teilpopulation hinzu. Diese kann sich entweder von außen, z.B. durch "Triggerung" von Stammzell- oder nicht proliferierenden differenzierten Kompartimenten in die Proliferationsphase zur Ausgangspopulation addieren, oder auch durch Absonderung einer nach ESF besonders schnell synthetisierenden Fraktion aus der Ausgangspopulation entstehen.
- b) Von der oben erwähnten ursprünglichen Gesamtpopulation subtrahiert sich eine langsam synthetisierende Teilpopulation: z.B. durch Rückführung proliferierender Zellen in die nicht-proliferierende Phase oder durch Zelluntergang.
- c) Jede einzelne Zelle der ursprünglich vorhandenen Normalpopulation reagiert auf ESF mit Erhöhung der DNS-Synthesegeschwindig-

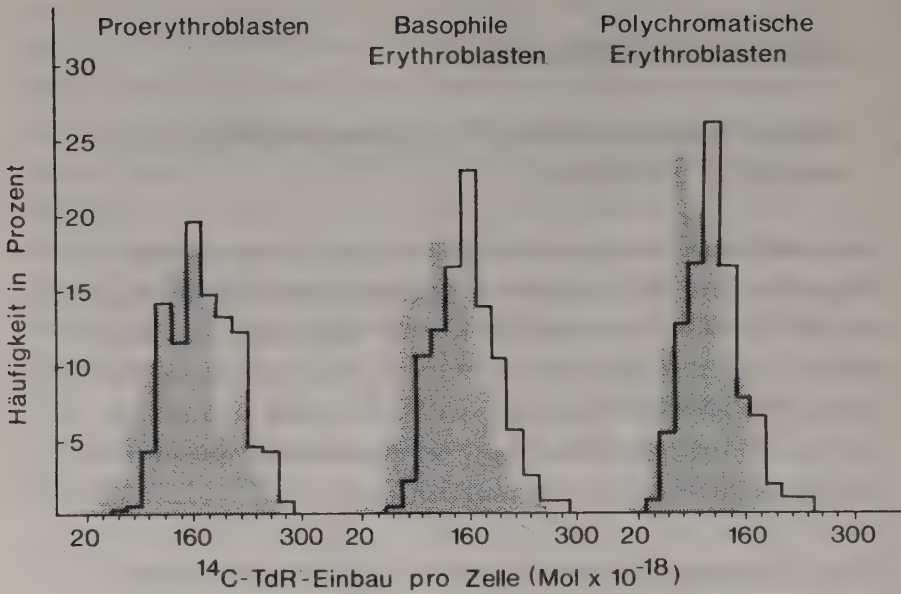


Abb. 5: Veränderung der Histogramme 8 Stunden nach Gabe des Erythropoetinpräparates (schraffierte Fläche = unbehandelte Kontrolltiere, durchgezogene Linien = 8 Stunden nach ESF-Gabe).

Jedes Histogramm enthält die gesammelten Einzelmessungen aus den 3 zugehörigen 12-Minuten-Inkubationen; entsprechend 200 - 300 ausgewerteten Zellen bei den Kontrolltieren und 100 - 150 ausgewerteten Zellen bei den ESF-behandelten Tieren.

keit. Der absolute und relative Betrag der Steigerung kann dabei von der Ausgangssyntheseleistung abhängig und vermutlich bei jeder Einzelzelle verschieden sein.

Die Frage, ob einer der beschriebenen Mechanismen allein oder überwiegend vorliegt, muß durch weitere Überlegungen geprüft werden: Insbesondere sollte das alleinige Vorliegen der Möglichkeit b) ausgeschlossen werden; hierdurch könnte nämlich eine Steigerung der durchschnittlichen Syntheseleistung pro Einzelzelle vorgetäuscht werden, ohne daß tatsächlich eine Synthesesteigerung in den einzelnen gemessenen Zellen stattgefunden hat.

- Wie die Häufigkeitsverteilungen, insbesondere deren Veränderung nach ESF-Gabe (Abb. 5) zeigen, entspricht der Mittelwerterhöhung 8 Stunden nach ESF eine annähernd parallele Verschiebung der Verteilungskurven nach rechts. Diese Art der Veränderung läßt sich am unkompliziertesten mit einer Steigerung der DNS-Synthese in jeder gemessenen Einzelzelle, also mit Mechanismus c) erklären.
- Die Tatsache, daß die Verteilungskurven insgesamt nach rechts verschoben sind, läßt die alleinige Wirksamkeit von Möglichkeit a) oder b) sehr unwahrscheinlich erscheinen. Jeder der beiden Mechanismen würde für sich allein eine deutliche inhomogene Veränderung der Verteilungskurven in Form einer unsymmetrischen Verzerrung der Häufigkeitsgipfel bewirken. Eine geringe Inhomogenität, wie sie durch Zusammenwirken von a) und b) oder a), b) und c) hervorgerufen würde, ist allerdings anhand der gefundenen Häufigkeitsverteilungen nicht sicher auszuschließen.
- Aufgrund der so kurz nach ESF unveränderten Zellzahlverhältnisse und Markierungsindizes im Erythroblastenkompartiment, sind

Mechanismen, welche Zellzahlveränderungen im proliferierenden differenzierten Kompartiment verursachen, bei den beschriebenen Versuchen in wesentlichem Umfang nicht beteiligt. Dies läßt wiederum ein Vorliegen der Möglichkeit b) allein sehr unwahrscheinlich werden.

Nach den vorausgegangenen Einschränkungen ergibt sich folgende abschließende Interpretation der Meßergebnisse: Innerhalb von 8 Stunden nach Gabe des aktiven Präparates wurde in allen untersuchten Reifestadien der Erythroblasten eine effektive Zunahme der DNS-Synthesegeschwindigkeit in jeder Einzelzelle entweder der gesamten beobachteten Population oder wesentlicher Fraktionen der beobachteten Population direkt gemessen.

Diese beträgt im Durchschnitt, also bezogen auf die Gesamtheit der gemessenen Population:

- 10 - 20 % (Vergleich mit unbehandelten polyglobulen Tieren)
- 30 - 40 % (Vergleich mit inaktivem Kontrollpräparat)

Die Frage, welche der beiden Vergleichsbasen die richtigen Steigerungsraten wiedergibt, ist nicht zu beantworten.

Zwar lassen die beschriebenen Ergebnisse erkennen, daß das Kontrollpräparat offenbar eine Suppressionswirkung auf die DNS-Synthese ausübt, doch muß in Analogie zu anderen Untersuchungen von ESF-Wirkungen (122, 126, 127) damit gerechnet werden, daß das aktive Präparat ebenfalls supprimierende Bestandteile - allerdings überlagert von stimulierenden Effekten - enthält. Der reine stimulierende Anteil des aktiven Präparates wird unter dieser Voraussetzung besser durch den Vergleich mit dem Kontrollpräparat wiedergegeben. Diese Argumentation hat vor allem dann praktische Bedeutung, wenn der Suppressionseffekt

beider Step-2-Präparate als präparationstechnisch bedingtes Artefakt gedeutet wird, welches im Ausgangsmaterial Urin nicht enthalten ist. Die Berechnung der ursprünglich pro Volumeneinheit Urin enthaltenen Aktivität ist dann überhaupt nur durch Vergleich mit dem Kontrollpräparat möglich.

2. Nachweis der ausschließlichen ESF-Wirkung

Die oben diskutierte Steigerung der DNS-Syntheserate pro Einzelzelle kann streng genommen nur dann als reiner ESF-Effekt angesehen werden, wenn andere nicht von exogenem ESF abhängige Beeinträchtigungen der DNS-Synthese, insbesondere deren Beeinflussung durch physiologische circadiane Schwankungen, ausgeschlossen sind.

Es kann allerdings angenommen werden, daß innerhalb der kurzen Zeitspanne (Nachmittag) in der alle Tiere getötet wurden, wesentliche tageszeitliche Schwankungen nicht auftraten; außerdem ist durch den kontinuierlichen Vergleich mit Kontrolltieren, welche stets in maximal 1/2-stündigem Abstand von den ESF-Tieren getötet wurden, ein zeitunabhängiger Maßstab gegeben.

3. Vergleichbarkeit mit anderen Untersuchungen

Vergleiche mit Ergebnissen aus der Literatur sind wenig ergiebig, weil kaum Arbeiten existieren, die vergleichbare Methoden im Zusammenhang mit Messungen der ESF-Wirkung verwenden.

Zahlreiche Autoren wiesen zwar eine Zunahme der DNS-Syntheserate wenige Stunden bis mehrere Tage nach ESF nach (31, 71, 83, 108, 152, 153, 157, 158, 160, 164, 172), doch wurden diese Bestimmungen fast ausschließlich durch Messung der Gesamt-DNS in einer morphologisch nicht näher klassifizierten Zellpopulation aus Knochenmark, Milz oder Leber durchgeführt. Diese Methode erlaubt

keine Unterscheidung der Zellen, so daß die gemessenen Veränderungen der Syntheseleistung keiner bestimmten Zellgruppe - Stammzellen, Erythroblasten, andere hämopoetische Zellen - sicher zugeordnet werden können. Dies führte bisher zu Unsicherheiten in der Frage, ob die beginnende Steigerung der DNS-Synthese nach Erythropoetin

- als Ausdruck der beginnenden Stammzelldifferenzierung (28, 71, 86, 108, 152),
- als Zeichen der proliferativen Aktivität des Stammzellpools zur Wiederauffüllung desselben (28, 62, 71),
- als Hinweis auf die nach Stammzelldifferenzierung einsetzende Proliferation der ersten Proerythroblasten (31, 83, 152),
- als Anzeichen für die Proliferationsaktivität der reifenden Erythroblasten (62, 86)

gedeutet werden soll.

Als weiterer Nachteil dieser Methode ist zu erwähnen, daß die Steigerung der Syntheserate in der Gesamtpopulation nicht als solche der Einzelzelle interpretiert werden darf. Sie kann ebenso durch andere Mechanismen, z.B. durch Übergang nicht proliferierender Erythroblasten in die proliferative Phase entstanden sein (86, 164).

Von den autoradiographischen Methoden wiederum sind nur solche vergleichbar, welche eine direkte Messung

- a) der DNS-Synthesegeschwindigkeit (Thymidineinbau pro Zeiteinheit)
- b) der Reziprokgröße t_s (DNS-Synthesedauer)

möglichst kurze Zeit nach ESF-Stimulus gestatten.

Dies leisten nur

bei a) die direkte Zählung der Silberkörner über der Einzelzelle

bei b) - mit gewissen theoretischen Einschränkungen -

I. die Doppelmarkierungsmethode mit ^{14}C - und ^3H -Thymidin

II. eine spezielle Anwendungsform der Markierte-Mitosen-Methode

Nur sehr wenige der autoradiographischen Arbeiten erfüllen die oben-
genannten Anforderungen:

Alpen und Lajtha (6) prüften den Effekt einer aktiven und einer
"inaktiven" ESF-Präparation aus menschlichem Urin (Aktivitäts-
standard nicht angegeben) auf den ^3H -Thymidin- bzw. ^{14}C -Format-
Einbau von menschlichen Erythroblasten in vitro. Die Messung er-
folgte durch Zählung der Silberkornzahl über basophilen Normoblasten.
Während des Beobachtungszeitraums 4 - 24 Stunden nach Präparatgabe
konnte keine signifikante Differenz zwischen den beiden Vergleichs-
gruppen gefunden werden.

Von Papayannopoulou und Finch (154) stammt eine Bestimmung von t_s
im normalen Mäuseknochenmark in vivo mit Hilfe der Markierte-
Mitosen-Methode und der Doppelmarkierungsmethode. Sie fanden nach
3-tägiger täglicher ESF-Gabe von 5 IU eine leichte Verkürzung der
Synthesephase

- von 6 auf 5,25 Stunden (frühe Normoblasten, markierte Mitosen)
- von 8,1 auf 6,6 Stunden (alle KM-Normoblasten, Doppelmarkierung)

Hanna, Tarbutt und Lamerton (80) untersuchten S-Phasen im normalen
Rattenknochenmark 2 Tage nach akuter Blutung oder nach 6-wöchiger
Phenylhydrazin-Behandlung (chronische Anämie) mit der Markierte-
Mitosen-Methode. Es ergab sich in beiden Fällen folgende leichte
Verkürzung von t_s :

Bei Proerythroblasten und Basophilen Erythroblasten von 7 Stunden
(normal) auf 5,8 Std. (Blutung) bzw. 5,5 Std. (Phenylhydrazin);
bei Polychromatischen Erythroblasten von 8 auf 6,5 bzw. 6,2 Stunden.

II. Lokalisierung des primären ESF-Stimulus

1. Ist die gemessene Synthesesteigerung auf eine primäre Stimulierung der Stammzelle zurückzuführen, die von dort ins differenzierte Kompartiment übertragen wurde?

Wie im allgemeinen Teil bereits angedeutet, ist nach der in der Literatur überwiegend vorherrschenden Meinung die primäre ESF-Wirkung auf die Differenzierung der Stammzelle bzw. der determinierten Stammzelle (ESC) gerichtet. Abgesehen von den wenigen Erscheinungen, welche als direkte ESF-Einwirkung auf das differenzierte Kompartiment anerkannt sind (Verkürzung der Generationszeit, direkte Freisetzung von Retikulozyten), müssen alle nach ESF beobachteten Veränderungen im Bereich der Erythroblasten - wie z.B. gesteigerte Syntheseleistungen der Zelle - zunächst als sekundäre Folge dieses Differenzierungsschrittes, d.h. als von der Stammzelle her übertragen angesehen werden.

Mögliche Mechanismen eines solchen Übertragungsvorgangs sind in anderem Zusammenhang bereits postuliert worden:

- die Aufnahme von ESF in die Zelle und dessen Bindung an die DNS ergibt zahlreiche Aspekte der Beeinflussung von DNS-Synthese, Zellteilung und sonstiger DNS-abhängiger Zellfunktionen über mehrere Zellgenerationen hinweg (163 a),
- stabile m-RNS-Systeme, welche unter ESF-Stimulus in der Stammzelle synthetisiert werden, können vermutlich über mehrere Zellteilungen hinweg übertragen werden und gewährleisten auf diese Weise z.B. die Fortführung der Hämoglobinsynthese in den differenzierten Zellreihen (60, 152).

Im Zusammenhang mit den eigenen Versuchsergebnissen stellt sich also die Frage, ob die nach ESF in Erythroblasten gemessene DNS-Synthesesteigerung von der Stammzelle her übertragen wurde.

a) Kriterien von Zellzahl und -relation

Die Abwesenheit bzw. starke zahlenmäßige Reduzierung der Erythroblasten im Zustand der Suppression wird generell als Ausdruck der verminderten Stammzelldifferenzierung infolge ESF-Mangels gedeutet. Umgekehrt ist die Zunahme der Proerythroblastenzahl nach ESF-Gabe mit nachfolgendem Ansteigen der späteren Blastenformen in Form einer "erythropoetischen Welle" als Zeichen der wieder mit höherer Rate einsetzenden Stammzelldifferenzierungen zu werten. Dieser Vorgang beginnt in der beschriebenen sichtbaren Form frühestens 15 - 24 Stunden nach ESF (38, 73, 144, 166).

In den vorliegenden Versuchen können Übertragungen von auf die Stammzelle gerichteten ESF-Stimuli in das Erythroblastenkompartiment im Verlauf einer solchen morphologisch definierten Differenzierungswelle mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden, da alle Beobachtungen innerhalb eines Zeitraums von 16 Stunden nach ESF durchgeführt wurden und zudem eine absolute Zunahme von Pro- oder anderen Erythroblasten weder innerhalb der ESF-behandelten Proben selbst, noch beim Vergleich mit unbehandelten Kontrolltieren festgestellt wurde.

b) Proliferationskinetische Kriterien

Die oben genannten Kriterien lassen zwar erkennen, daß nach ESF-Stimulus innerhalb der Beobachtungszeit keine neuen zusätzlichen Stammzelldifferenzierungen in wesentlichem Umfang stattgefunden haben; sie können jedoch nicht die Annahme widerlegen, daß schon vor ESF-Gabe, also im Zustand der maximalen Suppression, eine geringe basale Rate von Stammzelldifferenzierungen mit nachfolgen-

dem Fluß kontinuierlicher Reifeteilungen zur Aufrechterhaltung des vorgefundenen stark verkleinerten Erythroblastenkompartimentes vorgelegen haben muß. Dieser basale Zellstrom ist als "steady state" von der ESF-induzierten Welle neuer Stammzelldifferenzierungen völlig unabhängig und könnte nach Erythropoetingabe bestimmte Informationen zur Veränderung der Zellaktivität in die später ausgewerteten differenzierten Reifungsstufen übertragen haben, noch ehe die eigentliche erythropoetische Differenzierungswelle sichtbar einsetzte. Die zur Beantwortung dieser Frage entscheidend wichtige Fließgeschwindigkeit des erwähnten basalen Zellstroms, d.h. die Aufenthalts- oder Passagezeit der Zellen in den einzelnen morphologischen Kompartimenten (CTT) ist schwer zu beurteilen, da bisher proliferationskinetische Untersuchungen an der polyglobulen Maus nicht vorliegen.

Unter Zugrundelegung der bisher bekannten normalen Generationszeiten der Mäuseproerythroblasten von ca. 12 Stunden und der Rattenproerythroblasten von ca. 10 Stunden (99, 192 a) kann allerdings angenommen werden, daß die Übertragung der ESF-Wirkung auch auf dem oben genannten Weg vermutlich kaum über das erste proliferative Kompartiment nach der Stammzelldifferenzierung, sicher aber nicht wesentlich über das Proerythroblastenkompartiment hinaus stattgefunden haben kann:

Die in Einzelzellen des Erythroblastenkompartimentes gemessene gesteigerte DNS-Synthesegeschwindigkeit wurde demnach also durch unmittelbare ESF-Einwirkung auf dieses Kompartiment induziert. Dies gilt mit Sicherheit vor allem für die späteren Zellformen, d.h. basophile und polychromatische Erythroblasten.

2. Lokalisierung des ESF-Stimulus innerhalb des differenzierten Kompartimentes

Man kann darüber hinaus auch aussagen, daß der ESF-Stimulus direkt auf die proliferierenden differenzierten Zellen eingewirkt hat, da eine "Triggerung" nicht-proliferierender Erythroblasten in größerem Umfang wegen der vor und nach ESF unverändert hohen Markierungsindizes und der beobachteten Häufigkeitsverteilungen nicht anzunehmen ist. Es kann allerdings nicht bewiesen werden, daß die erste ESF-Einwirkung und die Messung des ESF-Effektes in der gleichen Zelle, d.h. innerhalb des gleichen proliferativen Kompartimentes geschehen sind. Der Zwischenraum von 8 Stunden läßt mindestens eine Zellteilung zwischen beiden Ereignissen möglich erscheinen.

III. Frage der unterschiedlichen Beeinflussung unterschiedlicher Erythroblastenformen durch ESF

In Abb. 4 zeigt die polychromatische Zellklasse 4 und 16 Stunden nach ESF einen wesentlich höheren Einbauzuwachs als die anderen beiden Zellklassen. Dieses Phänomen fällt sowohl beim Vergleich mit inaktivem Kontrollpräparat als auch mit unbehandelten Tieren auf.

Die Deutung dieser Beobachtungen kann quantitativ erfolgen, z.B. unter der Voraussetzung einer größeren Empfindlichkeit dieser Zellgruppe gegenüber niedrigeren ESF-Konzentrationen; oder aber zeitlich, z.B. unter der Annahme eines schnelleren Ansprechens des intrazellulären Apparates nach Anstieg des Serum-ESF und dementsprechend eines protrahierten Abfalls der Zellaktivität nach Absinken desselben.

Alle diese Denkmöglichkeiten passen, vom teleologischen Gesichtspunkt aus, gut zu anderen in der Literatur beschriebenen ESF-Wirkungen, die offenbar selektiv auf eine rasche Ausschüttung der reifsten Zellformen abzielen, wie z.B. relativ stärker beschleunigte Hämoglobinisierung oder relativ höherer Mitoseindex in späten Zellformen (10, 137) und beschleunigte oder vorzeitige Ausschüttung von Retikulozyten und späten kernhaltigen Formen (12, 81, 82, 188).

IV. Inhibitorische Wirkungen der untersuchten Urinpräparate

Die vom inaktiven Kontrollpräparat offenbar ausgeübte Suppressionswirkung läßt im Zusammenhang mit ähnlichen Beschreibungen in der Literatur an die Existenz eines spezifischen Inhibitors der DNS-Synthese denken. In den letzten Jahren wurde zunehmend häufig über Inhibitoren der Erythropoese berichtet. Auch hier zeigt sich jedoch, daß nur sehr wenige Arbeiten hinsichtlich ihrer Methodik zum Vergleich herangezogen werden können. Zur Anknüpfung an die eigenen Versuchsergebnisse müssen folgende Punkte diskutiert werden:

1. Vorkommen von EIF in Urin oder Urinpräparaten

Neben Plasma ist menschlicher Urin das am häufigsten verwendete Ausgangsmaterial zum Nachweis von EIF-Wirkungen und zur Herstellung von EIF-Präparaten: Vor allem Lewis und Lindemann (121, 122, 123, 124, 126, 127, 128) entwickelten Methoden zur Fraktionierung von Urinproteinen (Säulenchromatographie, Säulenelektrophorese, Elektrodialyse, Gelfiltration) und konnten damit nachweisen, daß sowohl bei vielen pathologischen Zuständen, wie bestimmten Anämie-

formen, Tumoren und chronischen Nierenerkrankungen, als auch bei gesunden Menschen sehr häufig inhibitorische (EIF) und stimulierende (ESF) Faktoren gleichzeitig nebeneinander in einer Urinprobe gefunden werden. So konnten beispielsweise durch Abtrennen von EIF-Fractionen vom Gesamtpräparat dessen ESF-Eigenschaften verstärkt werden und umgekehrt.

Zum Vergleich der geschilderten Ergebnisse mit eigenen Resultaten sind allerdings folgende kritische Einschränkungen zu machen:

- die in der Vergleichsliteratur beschriebenen EIF-Urinpräparationen wurden nach verschiedenen Methoden von sehr unterschiedlichen Patienten gewonnen. Eine exakte Übereinstimmung mit dem eigenen Material ist sicher nicht gegeben;
- zur Messung von Inhibitorwirkungen in Urinpräparaten wurden bisher fast ausschließlich Fe-Einbau-Versuche an der polyglobulen Maus verwendet; Untersuchungen zur Wirkung auf Zellproliferation und DNS-Synthesegeschwindigkeit sind bislang nicht bekannt.

2. Inhibition der Zellproliferation, insbesondere der DNS-Synthese

Die bisher am besten definierten, vielleicht sogar einzigen physiologischen Hemmstoffe der Zellproliferation, die sogenannten Chalone wurden auf dem Gebiet der Hämatopoese bisher am ausführlichsten von der Gruppe Rytömaa, Kiviniemi, Kivilaakso untersucht: Dabei wurde u.a. beschrieben, daß das Serum hypertransfundierter polyglobuler Ratten ca. 3 Stunden nach Zusatz zu normalem Rattenknochenmark in vitro eine supprimierende Wirkung auf

- den Gesamt-³H-TdR-Einbau der totalen KM-Zellen
- den ³H-TdR-Markierungsindex der Gesamt-Erythroblasten

ausübt. Beide Veränderungen sind aber nach Ansicht der Autoren in etwa proportional, so daß eine evtl. denkbare zusätzliche Inhibition der DNS-Synthesegeschwindigkeit pro Einzelzelle ausgeschlossen werden könne (98). Dies ist - soweit bekannt - die einzige Arbeit, welche sich mit Hemmwirkungen auf den Thymidineinbau von Erythroblasten beschäftigt.

Die einzige bekannte direkte Messung einer verminderten DNS-Synthesegeschwindigkeit an differenzierten hämopoetischen Einzelzellen nach Inhibitorapplikation mittels autoradiographischer Bestimmung der Silberkornzahl pro Zelle stammt ebenfalls von den og. Autoren; sie wurde allerdings an KM-Zellen der granulopoetischen Reihe durchgeführt (174): 3 und 7 Stunden nach Einwirkung des inhibitorischen Extraktes aus Blutzellen auf Rattenknochenmark in vitro ergab sich neben der Verminderung des ³H-TdR-Totaleinbaus und des Markierungsindex auch eine

Reduzierung der Silberkornzahl pro Zelle zwischen
20 und 40 % (abhängig von der Inhibitorkonzentration).

Dieser letztgenannte Effekt zeigt zwar grundsätzlich, daß die DNS-Synthesegeschwindigkeit durch exogen zugeführte Substanzen verlangsamt werden kann und bestätigt demzufolge die eigenen Ergebnisse; hinsichtlich der Diskussion über die Art des Inhibitors können jedoch unterschiedliche Standpunkte vertreten werden:

a) Rytömaa et al. (174) halten an der klassischen von Bullough (1965) geprägten Definition des Chalon-Mechanismus fest, wonach die Proliferationshemmung durch Blockierung des Zellzyklus ("switch"-Mechanismus), wahrscheinlich an der Stelle des Übergangs von der G₁- zur S-Phase, zustandekommt. Die Verlangsamung der DNS-Synthese kann demnach kein Chalon-Effekt sein und wird

von den genannten Autoren auf Unreinheiten bzw. unspezifische Wirkungen der Chalonpräparation zurückgeführt.

b) Ein anderer Mechanismus, der bisher - soweit bekannt - nicht in der Literatur erwähnt wurde, könnte auch unter Zugrundelegung der genannten spezifischen Chalonwirkung unter bestimmten Voraussetzungen zur Verminderung der mittleren Silberkornzahl führen: Wenn nämlich zwischen Einsetzen der Inhibitorwirkung und Applikation des markierten Thymidins eine genügend lange Zeitspanne liegt, können wesentliche Fraktionen der in der S-Phase befindlichen Zellpopulation das S-Kompartiment verlassen; und zwar treten innerhalb dieses fixen Zeitraums relativ mehr schnell synthetisierende als langsam synthetisierende Zellen aus. Daraus ergibt sich aber bei gleichzeitiger Blockierung des Einstroms in die S-Phase eine relative Akkumulation von langsam synthetisierenden Zellen im S-Kompartiment und damit eine Verschiebung des Häufigkeitsgipfels nach links bzw. des Mittelwerts nach unten.

Ob dieser Mechanismus bei den eigenen Ergebnissen eine entscheidende Rolle spielt, ist zweifelhaft; folgende Beobachtungen sprechen dagegen:

- durch Ausstrom synthetisierender und Zustrom nicht-synthetisierender Zellen müßte sich der Markierungsindex innerhalb jedes proliferierenden morphologischen Kompartiments verringern; er bleibt jedoch im Vergleich zu den Kontrolltieren konstant;
- nach Blockierung des kontinuierlichen Zellflusses durch die Kompartimente und Ansammlung von G_1 -Zellen wären Veränderungen von Relativ- und Absolutzellzahlen in den einzelnen Zell-

klassen zu erwarten; diese bleiben jedoch gegenüber den Kontrolltieren unverändert.

c) Schließlich könnte die Existenz eines spezifischen, die DNS-Synthese verlangsamenen Inhibitors vermutet werden. Diese Annahme wurde bisher noch nicht in größerem Umfang von anderen Untersuchern bestätigt.

F. Zusammenfassung

Ein aus menschlichem Urin gewonnenes und auf Aktivität geprüftes Erythropoetinpräparat wurde zur Untersuchung seines möglichen Einflusses auf die DNS-Synthesegeschwindigkeit von Erythroblasten in polyglobule Mäuse injiziert. Die Messung der DNS-Synthesegeschwindigkeit erfolgte wenige Stunden nach Präparatgabe durch in vitro-Kurzzeitmarkierung der Knochenmarkszellen mit ^{14}C -TdR und später nachfolgender Silberkornzählung über Einzelzellen dreier Reifestufen (Proerythroblasten, Basophile Erythroblasten, Polychromatische Erythroblasten) mittels quantitativer Auflichtphotometrie. Es fand sich 8 Stunden nach Erythropoetingabe eine gegenüber den Kontrollversuchen signifikante Steigerung der mittleren DNS-Synthesegeschwindigkeit in allen gemessenen Zellreihen. Aus der Diskussion ergibt sich, daß der gemessene Effekt offenbar einer direkten ESF-Einwirkung auf die differenzierten Zellformen zuzuschreiben ist und nicht mit der häufig beschriebenen Stammzelldifferenzierung nach Erythropoetin zusammenhängt.

Ein anderes, zu Kontrollzwecken hergestelltes Urin-Proteinpräparat bewirkte in derselben Versuchsanordnung eine leichte Suppression der DNS-Synthesegeschwindigkeit in Erythroblasten. Die Beobachtung wird im Zusammenhang mit ähnlichen in der Literatur beschriebenen Inhibitionsphänomenen diskutiert.

G. LITERATUR

- 1) ADAMSON, J.W.: The Erythropoietin/Hematocrit Relationship in Normal and Polycythemic Man: Implications of Marrow Regulation. Blood 32, 597-609 (1968)
- 2) ADAMSON, J.W. and C.A. FINCH: Erythropoietin and the Polycythemias. Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 560-563 (1968)
- 3) ALLAN, R.C. and D.J. MOORE: Preliminary Purification of Sheep and Mouse Erythropoietin by Vertical Flat Bed Discontinuous Electrophoresis in Acrylamide Gel. Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 63-70 (1968)
- 4) ALPEN, E.L. and D. CRANMORE: Observations on the Regulation of Erythropoiesis and on Cellular Dynamics by Fe⁵⁹ Autoradiography. in F. Stohlman, Jr. (ed.), The Kinetics of Cellular Proliferation, p. 290-300. New York & London: Grune & Stratton 1959
- 5) ALPEN, E.L., D. CRANMORE and M.E. JOHNSTON: Early Observation on the Effects of Blood Loss. in L.O. Jacobson and M. Doyle (eds.), Erythropoiesis, p. 184-188. New York & London: Grune & Stratton 1962
- 6) ALPEN, E.L., L.G. LAJTHA and D.C. VAN DYKE: Lack of Direct Effect of Erythropoietin on Human Erythroid Cells in vitro. Nature 184, 1228-1229 (1959)
- 7) BACIU, I.: Die humorale und nervöse Regelung der Erythropoese. Klin. Wschr. 48, 133-143 (1970)
- 8) BENESTAD, H.B., T. RYTÖMAA and K. KIVINIEMI: The Cell Specific Effect of the Granulocyte Chalone Demonstrated with the Diffusion Chamber Technique. Cell Tissue Kinet. 6, 147-154 (1973)
- 9) BORSOOK, H.: The Change of Hemoglobin Synthesis from Minor to Major in the Course of Erythroblast Maturation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 416-422 (1968)

- 10) BORSOOK, H., J.B. LINGREL, J.L. SCARO and R.L. MILLETTE: Synthesis of Haemoglobin in Relation to the Maturation of Erythroid Cells. *Nature* 196, 347-350 (1962)
- 11) BORSOOK, H., K. RATNER, B. TATTRIE, D. TEIGLER and L.G. LAJTHA: Erythropoietin and the Development of Erythrocytes. *Nature* 217, 1024-1026 (1968)
- 12) BRECHER, G. and F. STOHLMAN, Jr.: Reticulocyte Size and Erythropoietic Stimulation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 107, 887-891 (1961)
- 13) BRECHER, G. and F. STOHLMAN, Jr.: The Macrocytic Response to Erythropoietin Stimulation. in L.O. Jacobson and M. Doyle (eds.), *Erythropoiesis*, p. 216-221. New York & London: Grune & Stratton 1962
- 14) BRINKMANN, W.: Thymidineinbau- und DNS-Synthesegeschwindigkeit von Knochenmarkzellen in Vitro. *Diss.*, München 1970
- 15) BRINKMANN, W. und P. DÖRMER: In vitro-Verfahren zur Bestimmung der DNS-Synthese-Dauer einzelner Zellen. *Biochemische Voraussetzungen und Ergebnisse. Histochemie* 30, 335-343 (1972)
- 16) BRINKMANN, W., P. DÖRMER und P. MUSCHALIK: Die Bestimmung der DNS-Synthesezeit von Knochenmarkzellen in vitro durch quantitative Autoradiographie. *Klin. Wschr.* 47, 1327-1328 (1969)
- 17) BULLOUGH, W. S., T. RYTÖMAA: Mitotic Homeostasis. *Nature* 205, 573-578, (1965)
- 18) CAMISCOLI, J.F. and A.S. GORDON: Bioassay and Standardization of Erythropoietin. In A. S. Gordon (ed.), *Regulation of Hematopoiesis*, Vol. 1, p. 369-393, New York: Appleton-Century-Crofts, Educational Division, Meredith Corporation 1970
- 19) CAMISCOLI, J.F., A.H. WEINTRAUB and A.S. GORDON: Comparative Assay of Erythropoietin Standards. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 40 - 45 (1968)

- 20) CARNEVALI, C., G. LUCARELLI, L. FERRARI, V. RIZZOLI, A. PORCELLINI and U. BUTTURINI: Effect of Triiodothyronine Administration on the Regulatory Mechanism of Erythropoiesis. *Exp. Hematol.* 15, 58-66 (1968)
- 21) CONTRERA, J.F. and A.S. GORDON: The Renal Erythropoietic Factor. I. Studies on Its Purification and Properties. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 114-119 (1968)
- 22) COTES, P.M.: Quantitative Estimation of Erythropoietin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 12-17 (1968)
- 23) Mc CULLOCH, E.A.: Control of Hematopoiesis at the Cellular Level. In A. S. Gordon (ed.), *Regulation of Hematopoiesis*, Vol. 1, p. 132-159, New York: Appleton-Century-Crofts, Educational Division, Meredith Corporation 1970
- 24) DENNY, W.F., W.J. FLANIGAN and C.F. ZUKOSKI: Serial Erythropoietin Studies in Patients Undergoing Renal Homotransplantation. *J. Lab. clin. Med.* 67, 386-397 (1966)
- 25) DÖRMER, P.: Photometric Methods in Quantitative Autoradiography. In U. Lüttge (ed.), *Methods of Microautoradiography and Electron Probe X-ray Micro-Analysis*, p. 7-48, Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1972
- 26) DÖRMER, P.: Kinetics of Erythropoietic Cell Proliferation in Normal and Anemic Man. A New Approach Using Quantitative ^{14}C -Autoradiography. In W. Graumann, Z. Lojda, A.G.E. Pearse and T.H. Schiebler (eds.), *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, Vol. 6, No. 1, p. 1-83. Stuttgart: G. Fischer (1973)
- 27) DÖRMER, P.: Quantitative Autoradiography at the Cellular Level. In V. Neuhoff (ed.), *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*, Vol. 14, *Micromethods in Molecular Biology*, p. 347-393. Berlin/Heidelberg/New York: Springer (1973)
- 28) DUKES, P.P.: In Vitro Studies on DNA Synthesis of Bone Marrow Cells Stimulated by Erythropoietin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 437-444 (1968)

- 29) DUKES, P.P., D. HAMMOND, N.A. SHORE and J.A. ORTEGA: Differences between In Vivo and In Vitro Activities of Various Erythropoietin Preparations.
In Yehuda Matoth (ed.), Erythropoiesis, Regulatory Mechanisms and Developmental Aspects; Proceedings of the Tel Aviv University Conference on Erythropoiesis, 27 to 29 July 1970, Petah Tikva, p. 97-103, New York / London: Academic Press
- 30) ERSLEV, A.J.: The Effect of Anemic Anoxia on the Cellular Development of Nucleated Red Cells. Blood 14, 386-398 (1959)
- 31) ERSLEV, A.J.: Erythropoietin in Vitro. II. Effect on "Stem Cells". Blood 24, 331-342 (1964)
- 32) ERSLEV, A.J. and J.R. HUGHES: The Influence of Environment on Iron Incorporation and Mitotic Division in a Suspension of Normal Bone Marrow. Brit. J. Haemat. 6, 414-432 (1960)
- 33) ERSLEV, A.J., L.A. KAZAL, O. P. MILLER and K.-J. R. ABAIDOO: The Renal Erythropoietin Inhibitor.
In A. S. Gordon, Mario Condorelli, Cesare Peschle (eds.) Regulation of Erythropoiesis; Ist International Conference on Hematopoiesis, Capri, 13-14 X 1971, p. 217-222, Milano: The Publishing House "Il Ponte" (1972)
- 34) ESSERS, U., H. BRASS und K. SPICHER: Die aplastische Anämie bei Niereninsuffizienz - eine inhibitorische Wirkung des Urämieserums auf Erythropoetin? Klin. Wschr. 48, 92-95 (1970)
- 35) ESSERS, U. und H. MANN: Untersuchungen der Erythropoetinaktivität im Blut bei Anämien mit hypoplastischem und hyperplastischem Knochenmark. Med. Welt 21, 1851-1852 (1970)
- 36) ESSERS, U. und H. MANN: Die Erythropoetinaktivität des Blutes bei Anämie mit hypoplastischem und hyperplastischem Knochenmark. Blut 22, 297-305 (1971)
- 37) FAURA, J., C.W. GURNEY and W. FRIED: The Effect of Carbon Dioxide on Erythropoiesis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 456-461 (1968)

- 38) FILMANOWICZ, E. and C.W. GURNEY: Studies on Erythropoiesis. XVI. Response to a Single Dose of Erythropoietin in Polycythemic Mouse. *J. Lab. Clin. Med.* 57, 65-72 (1961)
- 39) FINNE, P.H.: Erythropoietin Production in Fetal Hypoxia and in Anemic Uremic Patients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 497-503 (1968)
- 40) FISCHER, S.: Studies on the Mechanism and Site of Action of Erythropoietin. in L.O. Jacobson and M. Doyle (eds.), *Erythropoiesis*, p. 204-215. New York & London: Grune & Stratton (1962)
- 41) FISHER, J.W., R.L. BUSUTTIL and B.L. ROH: Fluorescent Antibody Localization of Erythropoietin in the Glomerular Tuft of the Kidney. In Yehuda Matoth (ed.), *Erythropoiesis, Regulatory Mechanisms and Developmental Aspects; Proceedings of the Tel Aviv University Conference on Erythropoiesis*, 27 to 29 July 1970, Petah Tikva, p. 171-175, New York/London: Academic Press
- 42) FISHER, J.W., J.ESPADA, P. TAYLOR, J.J.L. LERTORA and B.L. ROH: A Radioimmunoassay for Human Urinary Erythropoietin. In A. S. Gordon, Mario Condorelli, Cesare Peschle (eds.) *Regulation of Erythropoiesis; 1st International Conference on Hematopoiesis, Capri, 13-14 X 1971*, p. 122-131, Milano: The Publishing House "Il Ponte"(1972)
- 43) FISHER, J.W., L.G. LAJTHA, A.S. BUTTOO and D.D. PORTEOUS: Direct Effects of Erythropoietin on the Bone Marrow of the Isolated Perfused Hind Limbs of Rabbits. *Brit. J. Haemat.* 1965, II, 342-349
- 44) FISHER, J.W. and J.W. LANGSTON: Effects of Testosterone, Cobalt and Hypoxia on Erythropoietin Production in the Isolated Perfused Dog Kidney. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 75-87 (1968)
- 45) FISHER, J.W., B.L. ROH, C. COUCH and W.O. NIGHTINGALE: Influence of Cobalt, Sheep Erythropoietin and Several Hormones on Erythropoiesis in Bone Marrows of Isolated Perfused Hind Limbs of Dogs. *Blood* 23, 87-98 (1964)

- 46) FISHER, J.W., B.L. ROH, L.A. MALGOR and R.J. NOVECK: Effects of Vasoactive Agents on Erythropoietin Production. In Yehuda Matoth (ed.), Erythropoiesis, Regulatory Mechanisms and Developmental Aspects; Proceedings of the Tel Aviv University Conference on Erythropoiesis, 27 to 29 July 1970, Petah Tikva, p. 155-162, New York/London: Academic Press
- 47) FISHER, J.W., A. SAMUELS and J. LANGSTON: Effects of Angiotensin, Norepinephrine and Renal Artery Constriction on Erythropoietin Production. Ann. N.Y. Acad. Sci. 149, 308-317 (1968)
- 48) FISHER, J.W., A.I. SAMUELS and L.A. MALGOR: Androgens and Erythropoiesis. In Yehuda Matoth (ed.), Erythropoiesis, Regulatory Mechanisms and Developmental Aspects; Proceedings of the Tel Aviv University Conference on Erythropoiesis, 27 to 29 July 1970, Petah Tikva, p. 70-78, New York/London: Academic Press
- 49) FISHER, J.W., W.J. STUCKEY, D.D. LINDHOLM and S. ABSHIRE: Extrarenal Erythropoietin Production. In Yehuda Matoth (ed.), Erythropoiesis, Regulatory Mechanisms and Developmental Aspects; Proceedings of the Tel Aviv University Conference on Erythropoiesis, 27 to 29 July 1970, Petah Tikva, p. 169-170, New York/London: Academic Press
- 50) FISHER, J.W., J.F. THOMPSON and J. ESPADA: A Radioimmunoassay for Human Urinary Erythropoietin. In Yehuda Matoth (ed.), Erythropoiesis, Regulatory Mechanisms and Developmental Aspects; Proceedings of the Tel Aviv University Conference on Erythropoiesis, 27 to 29 July 1970, Petah Tikva, p. 51-54, New York/London: Academic Press
- 51) FOGH, J.: The Increased Dose-Response of ESF after ESF Stimulation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 217-223 (1968)
- 52) FOGH, J.: Studies on the Mechanism of the Increased Dose-Response of Erythropoietin After Stimulation with Erythropoietin. Blood 35, 476-492 (1970)
- 53) FRENKEL, E.P., W. SUKI and J. BAUM: Some Observations on the Localization of Erythropoietin. Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 292-293 (1968)

- 54) FRIED, W. and C.W. GURNEY: The Erythropoietic-Stimulating Effects of Androgens. Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 356-365 (1968)
- 55) FROHLICH, E.D. and R.C. TARAZI: High Hematocrit in Hypertension and Its Relationship with Renal Arterial Disease. Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 569 (1968)
- 56) FRUHMANN, G.J.: Splenic Erythropoiesis.
In A. S. Gordon (ed.), Regulation of Hematopoiesis, Vol. 1, p. 339-368, New York: Appleton-Century-Crofts, Educational Division, Meredith Corporation (1970)
- 57) GALLAGHER, N.I. and R.M. DONATI: Inappropriate Erythropoietin Elaboration. Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 528-538 (1968)
- 58) GALLAGHER, N. I. and R. D. LANGE: Response to Erythropoietin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110, 422-426 (1962)
- 59) GALLAGHER, N.I., G.L. SEIFERT, J.L. CALLINAN, A.A. MAES and R.D. LANGE: Influence of Erythropoietin on Erythropoiesis in Polycythemic Rats. J. Lab. Clin. Med. 61, 258-265 (1963)
- 60) GALLIEN-LARTIGUE, O. and E. GOLDWASSER: On the Mechanism of Erythropoietin-induced Differentiation. I. The Effects of Specific Inhibitors on Hemoglobin Synthesis. Biochim. Biophys. Acta 103, 319-324 (1965)
- 61) GARCIA, J.F.: The Radioimmunoassay of Human Plasma Erythropoietin. In A. S. Gordon, Mario Condorelli, Cesare Peschle (eds.) Regulation of Erythropoiesis; 1st International Conference on Hematopoiesis, Capri, 13-14 X 1971, p. 132-153, Milano: The Publishing House "Il Ponte" (1972)
- 62) GOLDWASSER, E.: Some Molecular Aspects of Red Cell Differentiation. In A. S. Gordon, Mario Condorelli, Cesare Peschle (eds.) Regulation of Erythropoiesis; 1st International Conference on Hematopoiesis, Capri, 13-14 X 1971, p. 227-233, Milano: The Publishing House "Il Ponte" (1972)

- 63) GOLDWASSER, E. and C.K.H. KUNG: Progress in the Purification of Erythropoietin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 49-53 (1968)
- 64) GOLDWASSER, E. and C.K.-H. KUNG: Purification and Properties of Erythropoietin.
In A. S. Gordon, Mario Condorelli, Cesare Peschle (eds.) *Regulation of Erythropoiesis; 1st International Conference on Hematopoiesis, Capri, 13-14 X 1971*, p. 159-165, Milano: The Publishing House "Il Ponte" 1972
- 65) GORDON, A.S.: Humoral Influences on Blood Cell Formation and Release; in G.E.W. Wolstenholme & M.O.O'Connor (eds.), *Ciba Foundation Symposium on Haemopoiesis: Cell Production and Its Regulation*, p. 325-368. London: J. & A. Churchill (1960)
- 66) GORDON, A.S., J. LOBUE, B.S. DORNFEST and G.W. COOPER: Reticulocyte and Leukocyte Release from Isolated Perfused Rat Legs and Femurs. in L.O. Jacobson and M. Doyle (eds.), *Erythropoiesis*, p. 321-327, New York & London: Grune & Stratton (1962)
- 67) GORDON, A.S., E.A. MIRAND, J. WENIG, R. KATZ and E.D. ZANJANI: Androgen Actions on Erythropoiesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 318-335 (1968)
- 68) GORDON, A.S. and E.D. ZANJANI: Some Aspects of Erythropoietin Physiology.
In A. S. Gordon (ed.), *Regulation of Hematopoiesis, Vol. 1*, p. 413-457, New York: Appleton-Century-Crofts, Educational Division, Meredith Corporation (1970)
- 69) GORDON, A.S. and E.D. ZANJANI: Mechanisms of Erythropoietin Production.
In Yehuda Matoth (ed.), *Erythropoiesis, Regulatory Mechanisms and Developmental Aspects; Proceedings of the Tel Aviv University Conference on Erythropoiesis, 27 to 29 July 1970, Petah Tikva*, p. 141-149, New York/London: Academic Press
- 70) GROSS, M. and E. GOLDWASSER: On the Mechanism of Erythropoietin-induced Differentiation. V. Characterization of the Ribonucleic Acid Formed as a Result of Erythropoietin Action. *Biochem.* 8, 1795-1805 (1969)

- 71) GROSS, M. and E. GOLDWASSER: On the Mechanism of Erythropoietin-induced Differentiation. VII. The Relationship between Stimulated Deoxyribonucleic Acid Synthesis and Ribonucleic Acid Synthesis. *J. Bio. Chem.* 245, 1632-1636 (1970)
- 72) GURNEY, C.W., R. DEGOWIN, D. HOFSTRA and J. BYRON: Applications of Erythropoietin to Biological Investigation. in L.O. Jacobson and M. Doyle (eds.), *Erythropoiesis*, p. 151-161. New York & London: Grune & Stratton (1962)
- 73) GURNEY, C.W., N. WACKMAN and E. FILMANOWICZ: Studies on Erythropoiesis. XVII. Some Quantitative Aspects of the Erythropoietic Response to Erythropoietin. *Blood* 17, 531-546 (1961)
- 74) GUTNISKY, A., L. MALGOR, M. L. NOHR and D. VAN DYKE: Collection of Erythropoietin from Urine of Patients with Anemia Secondary to Hookworm. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 564-568 (1968)
- 75) HALVORSEN, S.: Effects of Hypothalamic Stimulation on Erythropoiesis and on the Production of Erythropoiesis-Stimulating Factors in Intact and Nephrectomized Rabbits. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 88-93 (1968)
- 76) HALVORSEN, S., R.P. WHITE, B.L. ROH and J.W. FISHER: Hypothalamic Influences on Erythropoiesis. Effects of Hypothalamic Stimulation on Plasma Erythropoietic Activity and Renal Blood Flow in Intact and Hypophysectomized Rabbits. In A. S. Gordon, Mario Condorelli, Cesare Peschle (eds.) *Regulation of Erythropoiesis; Ist International Conference on Hematopoiesis, Capri, 13-14 X 1971*, p. 247-257, Milano: The Publishing House "Il Ponte" 1972
- 77) HAMMOND, G.D., A. ISHIKAWA and G. KEIGHLEY: Relationship Between Erythropoietin and Severity of Anemia in Hypoplastic and Hemolytic States. in L.O. Jacobson & M. Doyle (eds.), *Erythropoiesis*, p. 351-358. New York & London: Grune & Stratton (1962)
- 78) HAMMOND, D., N. SHORE and N. MOVASSAGHI: Production, Utilization and Excretion of Erythropoietin: I. Chronic Anemias. II. Aplastic Crisis. III. Erythropoietic Effects of Normal Plasma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 516-527 (1968)

- 79) HANNA, I.R.A.: An Early Response of the Morphologically Recognizable Erythroid Precursors to Bleeding. *Cell Tissue Kinet.* 1, 91-99 (1968)
- 80) HANNA, I.R.A., R.G. TARBUTT and L.F. LAMERTON: Shortening of the Cell-Cycle Time of Erythroid Precursors in Response to Anaemia. *Brit. J. Haemat.* 16, 381-387 (1969)
- 81) HILLMAN, R.S.: Characteristics of Marrow Production and Reticulocyte Maturation in Normal Man in Response to Anemia. *J. Clin. Invest.* 48, 443-453 (1969)
- 82) HILLMAN, R.S.: Mechanisms Underlying Abnormal Erythropoiesis. In A. S. Gordon (ed.), *Regulation of Hematopoiesis*, Vol.1; p. 579-609, New York: Appleton-Century-Crofts, Educational Division, Meredith Corporation (1970)
- 83) HODGSON, G.: Synthesis of RNA and DNA at Various Intervals After Erythropoietin Injection in Transfused Mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124, 1045-1047 (1967)
- 84) HODGSON, G.: Effect of Vinblastine and 4-Amino-N¹⁰ Methyl Pteroyl-Glutamic Acid on the Erythropoietin Responsive Cell. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 125, 1206-1209 (1967)
- 85) HODGSON, G.: Application of Control Theory to the Study of Erythropoiesis. In A. S. Gordon (ed.), *Regulation of Hematopoiesis*, Vol. 1, p. 327-337, New York: Appleton-Century-Crofts, Educational Division, Meredith Corporation (1970)
- 86) HODGSON, G.: Mechanism of Action of Erythropoietin. In A. S. Gordon (ed.), *Regulation of Hematopoiesis*, Vol. 1, p. 459-469, New York: Appleton-Century-Crofts, Educational Division, Meredith Corporation (1970)
- 87) HODGSON, G. and I. ESKUCHE: Changes in the Erythropoietin-Responsive Cell After Exposure to Irradiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 230-235 (1968)
- 88) HODGSON, G., D. YUDILEVICH, I. ESKUCHE and M. PERRETTA: Relation Between Plasma Iron Turnover and Plasma Iron Concentration at Different Levels of Erythropoiesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104, 438-441 (1960)

- 89) HOLLAN, S.R.: Über die neurale Regulation der Blutzellen. *Folia haemat.* (Leipzig) 80, 138-152 (1963)
- 90) ITO, K., J.W. SCHMAUS and K.R. REISSMANN: Protein Metabolism and Erythropoiesis. III. The Erythroid Marrow in Protein-Starved Rats and Its Response to Erythropoietin. *Acta haemat.* 32, 257-264 (1964)
- 91) JACOBS, P. and C.A. FINCH: Iron for Erythropoiesis. *Blood* 37, 220-230 (1971)
- 92) JACOBSON, L.O., E. GOLDWASSER and C.W. GURNEY: Transfusion-induced Polycythaemia as a Model for Studying Factors Influencing Erythropoiesis. in G.E.W. Wolstenholme and M.O.O' Connor (eds.), Ciba Foundation Symposium on Haemopoiesis: Cell Production and Its Regulation, p. 423-445, London: J. & A. Churchill (1960)
- 93) JACOBSON, L.O., E. GOLDWASSER, L.F. PLZAK and W. FRIED: Studies on Erythropoiesis. Part IV. Reticulocyte Response of Hypophysectomized and Polycythemic Rodents to Erythropoietin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 94, 243-249 (1957)
- 94) JEPSON, J. H. and L. LOWENSTEIN: Inhibition of Erythropoiesis by a Factor Present in the Plasma of Patients with Erythroblastopenia. *Blood* 27, 425-434 (1966)
- 95) KATZ, R., G.W. COOPER, A.S. GORDON and E.D. ZANJANI: Studies on the Site of Production of Erythropoietin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 120-127 (1968)
- 96) KAZAL, L.A., A.J. ERSLEV, O.P. MILLER and K.-J.R. ABAIDOO: Inhibition of Erythropoietin by Lipid Extracts of Kidney and other Tissues. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2, 209-216 (1972)
- 97) KEIGHLEY, G.: Further Experiences with Assays, Units, and Standards of Erythropoietin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 18-24 (1968)
- 98) KIVILAKSO, E. and T. RYTÖMÄ: The Effect of Polycythaemic Serum on the Proliferation of Rat Bone Marrow Cells in Vitro. *Cell Tissue Kinet.* 3, 385-392 (1970)

- 99) KLEIN, H.O., K.J. LENNARTZ, M. EDER und R. GROSS: Autoradiographische und hämatologische Untersuchung zur Zellkinetik der Erythroblasten im Kurzzeitversuch nach doppelseitiger Nephrektomie und Ureterligatur bei Mäusen. *Blut* 19, 449-456 (1969)
- 100) KORST, D.R. and J. QUICK: Humoral Effects on Marrow Cell Differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 236-248 (1968)
- 101) KRANTZ, S.B.: Studies on Red Cell Aplasia. IV. Treatment with Immonosuppressive Drugs.
In A. S. Gordon, Mario Condorelli, Cesare Peschle (eds.) Regulation of Erythropoiesis; Ist International Conference on Hematopoiesis, Capri, 13-14 X 1971, p. 312-330, Milano: The Publishing House "Il Ponte" (1972)
- 102) KRANTZ, S.B. and E. GOLDWASSER: On the Mechanism of Erythropoietin-induced Differentiation. II. The Effect on RNA Synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 103, 325-332(1965)
- 103) KRETCHMAR, A.L.: Erythropoietin: Hypothesis of Action Tested by Analog Computer. *Science* 152, 367-370 (1966)
- 104) KRUGERS DAGNEAUX, P.G.L.C., R. GOUDSMIT and H.W. KRIJNEN: Investigations on an Immunoassay of Erythropoietin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 294-297 (1968)
- 105) KRZYMOWSKI, T. and H. KRZYMOWSKA: Studies on the Erythropoiesis Inhibiting Factor in the Plasma of Animals with Transfusion Polycythemia. *Blood* 19, 38-44 (1962)
- 106) KUNA, S., A.S. GORDON, B.S. MORSE, F.B. LANE III and H.A. CHARIPPER: Bone Marrow Function in Perfused Isolated Hind Legs of Rats. *Amer. J. Physiol.* 196, 769-774 (1959)
- 107) KURATOWSKA, Z.: The Renal Mechanism of the Formation and Inactivation of Erythropoietin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 128-134 (1968)
- 108) KURTIDES, E.S., W.A. RAMBACH, H.L. ALT and J.C. WURSTER: Effect of Erythropoietin on Tritiated Thymidine Incorporation by the Rat Spleen. *J. Lab. & Clin. Med.* 61, 23-33 (1963)

- 109) LAJTHA, L.G.: Recent Studies in Erythroid Differentiation and Proliferation. *Medicine* 43, 625-633 (1964)
- 110) LAJTHA, L.G.: Cellular Mechanism of Red Cell Production. *Ser. Haematol.* 2, 26-33 (1965)
- 111) LAJTHA, L.G.: Stem Cell Kinetics.
In A.S. Gordon (ed.), *Regulation of Hematopoiesis*, Vol. 1, p. 111-131, New York: Appleton-Century-Crofts, Educational Division, Meredith Corporation (1970)
- 112) LAJTHA, L.G.: Kinetics of Proliferation and Differentiation in Haemopoiesis.
In A. S. Gordon, Mario Condorelli, Cesare Peschle (eds.) *Regulation of Erythropoiesis; 1st International Conference on Hematopoiesis, Capri, 13-14 X 1971*, p. 47-50, Milano: The Publishing House "Il Ponte" (1972)
- 113) LAJTHA, L.G. and R. OLIVER: Studies on the Kinetics of Erythropoiesis: A Model of the Erythron. in G.E.W. Wolstenholme & M.O. O'Connor (eds.), *Ciba Foundation Symposium on Haemopoiesis: Cell Production and Its Regulation*, p. 289-324. London: J. & A. Churchill (1960)
- 114) LAJTHA, L.G., R. OLIVER and C.W. GURNEY: Kinetic Model of a Bone-Marrow Stem-Cell Population. *Brit. J. Haemat.* 8, 442-460 (1962)
- 115) LANGE, R.D., T.P. McDONALD, T.A. JORDAN, T.J. MITCHELL and A.L. KRETCHMAR: The Hemagglutination Inhibition Assay for Erythropoietin. Its Specificity, Reproducibility and Sensitivity. In Yehuda Matoth (ed.), *Erythropoiesis, Regulatory Mechanisms and Developmental Aspects; Proceedings of the Tel Aviv University Conference on Erythropoiesis, 27 to 29 July 1970, Petah Tikva*, p. 39-50, New York/London: Academic Press
- 116) LANGE, R.D., L.F. O'GRADY, J.P. LEWIS and F.E. TROBAUGH, Jr.: Application of Erythropoietin Antisera to Studies of Erythropoiesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 281-291 (1968)

- 117) LANGE, R.D., T.A. JORDAN and T.P. McDONALD: Partial Characterization of an Antiserum to Erythropoietin.
In Yehuda Matoth (ed.), Erythropoiesis, Regulatory Mechanisms and Developmental Aspects; Proceedings of the Tel Aviv University Conference on Erythropoiesis, 27 to 29 July 1970, Petah Tikva, p. 55-62, New York/London: Academic Press
- 118) LANGE, R.D., T.A. JORDAN, A.T. ICHIKI and A.I. CHERNOFF: Hemagglutination-Inhibition Assay for Erythropoietin.
In A. S. Gordon, Mario Condorelli, Cesare Peschle (eds.) Regulation of Erythropoiesis; 1st International Conference on Hematopoiesis, Capri, 13-14 X 1971, p. 107-118, Milano: The Publishing House "Il Ponte" (1972)
- 119) LANGE, R.D., M.L. SIMMONS and T.P. McDONALD: Use of Silicone Rubber Membrane Enclosures for Preparation of Erythropoietin Assay Mice. Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 34-39 (1968)
- 120) LEWIS, J.P., A. MILLER and T.H.J. HUISMAN: The Influence of Antiserum to Human Erythropoietin on the Production of Hemoglobin C in Goats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 134, 990-992 (1970)
- 121) LEWIS, J.P., R.R. MOORES, E. GARDNER, Jr., D.A. ALFORD, W.A. NEAL, E.T. WELCH, C.-S. WRIGHT and L.L. SMITH: Recent Advances in the Study of Erythropoietic Factors. in 7th int. Congr. clin. Chem., Geneva/Evian Vol. 3; Hormones, Lipids and Miscellaneous, p. 384-397, Karger, Basel/München/Paris/New York (1970)
- 122) LEWIS, J.P., W.A. NEAL, R.R. MOORES, E. GARDNER, Jr., D.A. ALFORD, L.L. SMITH, C.-S. WRIGHT and E.T. WELCH: A Protein Inhibitor of Erythropoiesis. J. Lab. Clin. Med. 74, 608-613 (1969)
- 123) LEWIS, J.P., W.A. NEAL, E.T. WELCH, W.G. LEWIS III, C.M. DUBOSE, Jr., C.-S. WRIGHT and L.L. SMITH: The Isolation of Erythropoiesis Regulatory Factors by an Electrofractionation Technique Combined with Selective Membrane Permeability. Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 142, 293-298 (1973)
- 124) LINDEMANN, R.: Erythropoiesis Inhibiting Factor in Urine.
In Yehuda Matoth (ed.), Erythropoiesis, Regulatory Mechanisms and Developmental Aspects; Proceedings of the Tel Aviv University Conference on Erythropoiesis, 27 to 29 July 1970, Petah Tikva, p. 185-189, New York/London: Academic Press

- 125) LINDEMANN, R.: Erythropoiesis-Inhibiting Factor in Urine. *Lancet* 1, 781 (1970)
- 126) LINDEMANN, R.: Erythropoiesis Inhibiting Factor (EIF). I. Fractionation and Demonstration of Urinary EIF. *Brit. J. Haemat.* 21, 623-631 (1971)
- 127) LINDEMANN, R.: Erythropoiesis Inhibiting Factor in Urine. *Israel J. Med. Sci.* 7, 1007-1011 (1971)
- 128) LINDEMANN, R.: Erythropoiesis Inhibiting Factor (EIF). The Inhibitory Effect of Oestrogens on Erythropoiesis and the Content of Oestrogens in the Urinary EIF. *Scand. J. Haemat.* 11, 319-324 (1973)
- 129) LINMAN, J.W. and R.V. PIERRE: Studies on the Erythropoietic Effects of Hyperbaric Hyperoxia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 25-33 (1968)
- 130) LORD, B.I.: Erythropoietic Cell Proliferation during Recovery from Acute Haemorrhage. *Brit. J. Haemat.* 13, 160-167 (1967)
- 131) LOWY, P.H.: Preparation and Chemistry of Erythropoietin. In A. S. Gordon (ed.), *Regulation of Hematopoiesis*, Vol. 1, p. 395-412, New York: Appleton-Century-Crofts, Educational Division, Meredith Corporation (1970)
- 132) LOWY, P.H. and G. KEIGHLEY: The Fractionation of Erythropoietin from Anemic and Normal Human Urine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 54-62 (1968)
- 133) LOZZIO, B.B., T.P. McDONALD and R.D. LANGE: Erythropoietin Formation in Rats Bearing Congenital Hydronephrosis. In Yehuda Matoth (ed.), *Erythropoiesis, Regulatory Mechanisms and Developmental Aspects; Proceedings of the Tel Aviv University Conference on Erythropoiesis*, 27 to 29 July 1970, Petah Tikva, p. 179-183, New York/London: Academic Press
- 134) MARKS, F.: A Tissue-Specific Factor Inhibiting DNA Synthesis in Mouse Epidermis. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 38, 79-90 (1973)
- 135) MATOTH, Y.: In Vitro Methods in the Study of Erythropoietin. In L.O. Jacobson & M. Doyle (eds.), *Erythropoiesis*, p. 299-303. New York & London: Grune & Stratton (1962)

- 136) MATOTH, Y. and E. BEN-PORATH (ARKIN): Effect of Erythropoietin on the Mitotic Rate of Erythroblasts in Bone Marrow Cultures. *J. Lab. Clin. Med.* 54, 722-727 (1959)
- 137) MATOTH, Y. and L. KAUFMANN: Mitotic Activity in Vitro of Erythroblasts Previously Exposed to Erythropoietin. *Blood* 20, 165-172 (1962)
- 138) MIRAND, E.A.: Extra-Renal and Renal Control of Erythropoietin Production. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 94-106 (1968)
- 139) MIRAND, E.A. and G.P. MURPHY: Erythropoietin Activity in Anephric Humans.
In A. S. Gordon, Mario Condorelli, Cesare Peschle (eds.) Regulation of Erythropoiesis; Ist International Conference on Hematopoiesis, Capri, 13-14 X 1971, p. 305-310, Milano: The Publishing House "Il Ponte" 1972
- 140) MITUS, W.J., K. TOYAMA and M.J. BRAUER: Erythrocytosis, Juxtaglomerular Apparatus (JGA), and Erythropoietin in the Course of Experimental Unilateral Hydronephrosis in Rabbits. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 107-113 (1968)
- 141) MOORES, R.R., F. STOHLMAN, Jr. and G. BRECHER: Humoral Regulation of Erythropoiesis. XI. The Pattern of Response to Specific Therapy in Iron Deficiency Anemia. *Blood* 22, 286-294 (1963)
- 142) MORIYAMA, Y.: The Mechanism and Site of Action of Erythropoietic Inhibiting Factor in Uremia.
In Yehuda Matoth (ed.), Erythropoiesis, Regulatory Mechanisms and Developmental Aspects; Proceedings of the Tel Aviv University Conference on Erythropoiesis, 27 to 29 July 1970, Petah Tikva, p. 190-193, New York/London: Academic Press
- 143) MORIYAMA, Y. and T. SHIMOTORI: Studies on Erythropoiesis Inhibiting Factor (EIF). II. The Site of Formation of EIF. *Acta haemat.* 44, 321-326 (1970)
- 144) MORSE, B.S. and F. STOHLMAN, Jr.: Regulation of Erythropoiesis. XVIII. The Effect of Vincristine and Erythropoietin on Bone Marrow. *J. Clin. Invest.* 45, 1241-1250 (1966)

- 145) MOVASSAGHI, N., N.A. SHORE and D. HAMMOND: Serum and Urinary Levels of Erythropoietin in Iron Deficiency Anemia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126, 615-618 (1967)
- 146) MUIRHEAD, E.E., B.E. LEACH, J.W. FISHER and M. KOSINSKI: Renal Transplantation and Extracts and Erythropoiesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 135-142 (1968)
- 147) NAETS, J.P. and M. WITTEK: The Mechanism of Action of Androgens on Erythropoiesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 366-376 (1968)
- 148) NAKAO, K., F. TAKAKU and S. CHIBA: Erythropoiesis in Anephric or Kidney Transplanted Patients.
In Yehuda Matoth (ed.), *Erythropoiesis, Regulatory Mechanisms and Developmental Aspects; Proceedings of the Tel Aviv University Conference on Erythropoiesis*, 27 to 29 July 1970, Petah Tikva, p. 164-167, New York/London: Academic Press
- 149) NECHELES, T.F., R.G. SHEEHAN and H.J. MEYER: Studies on the Control of Hemoglobin Synthesis: Nucleic Acid Synthesis and Normoblast Proliferation in the Presence of Erythropoietin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 449-455 (1968)
- 150) ORLIC, D.: Ultrastructural Analysis of Erythropoiesis.
In A. S. Gordon (ed.), *Regulation of Hematopoiesis*, Vol. 1, p. 271-296, New York: Appleton-Century-Crofts, Educational Division, Meredith Corporation (1970)
- 151) ORLIC, D.: Ultrastructural Analysis of the Differentiative Action of Erythropoietin on Erythropoiesis.
In A. S. Gordon, Mario Condorelli, Cesare Peschle (eds.), *Regulation of Erythropoiesis; Ist International Conference on Hematopoiesis*, Capri, 13-14 X 1971, p. 24-42, Milano: The Publishing House "Il Ponte" (1972)
- 152) ORLIC, D., A.S. GORDON and J.A.G. RHODIN: Ultrastructural and Autoradiographic Studies of Erythropoietin-Induced Red Cell Production. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 198-216 (1968)

- 153) ORTEGA, J.A. and P.P. DUKES: Relationship between Erythropoietin Effect and Reduced DNA Synthesis in Marrow Cell Cultures. *Biochim. Biophys. Acta* 204, 334-339 (1970)
- 154) PAPAYANNOPOULOU, T. and C.A. FINCH: On the In Vivo Action of Erythropoietin: A Quantitative Analysis. *J. Clin. Invest.* 51, 1179-1185 (1972)
- 155) PAKOVITS, W.R.: Control of Granulocyte Production: Separation and Chemical Identification of a Specific Inhibitor (Chalone). *Cell Tissue Kinet.* 4, 539-547 (1971)
- 156) PAUKOVITS, W.R.: Chalone. Endogene Inhibitoren der Zellteilung? *Blut* 27, 217-222 (1973)
- 157) PAUL, J. and J.A. HUNTER: DNA Synthesis is Essential for Increased Haemoglobin Synthesis in Response to Erythropoietin. *Nature* 219, 1362-1363 (1968)
- 158) PAUL, J. and J.A. HUNTER: Synthesis of Macromolecules during Induction of Haemoglobin Synthesis by Erythropoietin. *J. Mol. Biol.* 42, 31-41 (1969)
- 159) PAULO, L.G. B.L. ROH and J.W. FISHER: The Role of the Carotid Body and the Hypothalamus in the Control of Erythropoiesis. In A. S. Gordon, Mario Condorelli, Cesare Peschle (eds.) *Regulation of Erythropoiesis; Ist International Conference on Hematopoiesis. Capri, 13-14 X 1971*, p. 258-266, Milano: The Publishing House "Il Ponte" (1972)
- 160) PERRETTA, M. and C. TIRAPEGUI: Effect of Erythropoietin on Nucleic Acid Metabolism from Polycythemic Rat Bone Marrow. *Experientia* 24, 680-681 (1968)
- 161) PESCHLE, C., G.F. SASSO, I.A. RAPPAPORT, F. ROSSANIGO, A.S. GORDON and M. CONDORELLI: Hormonal Influences on Erythropoiesis and Erythropoietin Production. In A. S. Gordon, Mario Condorelli, Cesare Peschle (eds.), *Regulation of Erythropoiesis; Ist International Conference on Hematopoiesis, Capri, 13-14 X 1971*, p. 269-299, Milano: The Publishing House "Il Ponte" 1972

- 162) PESCHLE, C., E.D. ZANJANI, R. ZALUSKY, G. MASTROBERARDINO, A.L. OSSIAS, A.S. GORDON and M. CONDORELLI: Mechanisms Underlying Erythroid Dyscrasias in Man.
In A. S. Gordon, Mario Condorelli, Cesare Peschle (eds.) Regulation of Erythropoiesis; Ist International Conference on Hematopoiesis. Capri, 13-14 X 1971, p. 343-361, Milano: The Publishing House "Il Ponte" (1972)
- 163) PILIERO, S.J., P.T. MEDICI and C. HABER: The Interrelationships of the Endocrine and Erythropoietic Systems in the Rat with Special Reference to the Mechanism of Action of Estradiol and Testosterone. Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 336-355 (1968)
- 163a) PINTO, B.: Effect of Erythropoietin on Red Cell Differentiation Binding of Erythropoietin to DNA. Experientia 24, 489-491 (1968)
- 164) POWSNER, E.R. and L. BERMAN: Effect of Erythropoietin on DNA Synthesis by Erythroblasts in Vitro. Blood 30, 189-197 (1967)
- 165) REIFF, R.H., J.Y. NUTTER, D. M. DONOHUE and C.A. FINCH: The Relative Number of Marrow Reticulocytes. Amer. J. Clin. Path. 30, 199-203 (1958)
- 166) REISSMANN, K.R. and K. ITO: Selective Eradication of Erythropoiesis by Actinomycin D as a Result of Interference with Hormonally Controlled Effector Pathway of Cell Differentiation. Blood 28, 201-212 (1966)
- 167) RENCRICCA, N.J., J. SOLOMON, W.J. FIMIAN, D. HOWARD, V. RIZZOLI and F. STOHLMAN, Jr.: The Effect of Testosterone on Erythropoiesis. Scand. J. Haemat. 6, 431-436 (1969)
- 168) REYNAFARJE, C.: Humoral Regulation of the Erythropoietic Depression of High Altitude Polycythemic Subjects After Return to Sea Level. Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 472-474 (1968)
- 169) ROSSE, C., D.A. GRIFFITHS, A.E. EDWARDS, C.G.C. GACHES, A.H.L. LONG, J.L.W. WRIGHT and J.M. YOFFEY: Identity of Erythroblast Precursors in Bone Marrow. Acta haemat. 43, 80-88 (1970)

- 170) ROSSE, W.F. and T.A. WALDMANN: The Metabolism of Erythropoietin in Patients with Anemia Due to Deficient Erythropoiesis. *J. Clin. Invest.* 43, 1348-1354 (1964)
- 171) ROTHBERG, S. and B.C. ARP: Epidermal Chalone and Inhibition of DNA Synthesis. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 38, 93-98 (1973)
- 172) RUDOLPH, W. and M. PERRETTA: Effects of Erythropoietin on ^{14}C -Formate Uptake by Spleen and Bone Marrow Nucleic Acids of Erythrocyte-Transfused Mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124, 1041-1045 (1967)
- 173) RYTÖMAA, T. and K. KIVINIEMI: Control of Granulocyte Production. I. Chalone and Antichalone, Two Specific Humoral Regulators. *Cell Tissue Kinet.* 1, 329-340 (1968)
- 174) RYTÖMAA, T. and K. KIVINIEMI: Control of Granulocyte Production. II. Mode of Action of Chalone and Antichalone. *Cell Tissue Kinet.* 1, 341-350 (1968)
- 175) SCHOOLEY, J.C.: Responsiveness of Hematopoietic Tissue to Erythropoietin in Relation to the Time of Administration and Duration of Action of the Hormone. *Blood* 25, 795-808 (1965)
- 176) SCHOOLEY, J. C., J.F. GARCIA, L.N. CANTOR and V.W. HAVENS: A Summary of Some Studies on Erythropoiesis Using Anti-Erythropoietin Immune Serum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 266-280 (1968)
- 177) SCHOOLEY, J.C. and D.H.Y. LIN: Hematopoiesis and the Colony-Forming Unit.
In A. S. Gordon, Mario Condorelli, Cesare Peschle (eds.), Regulation of Erythropoiesis; 1st International Conference on Hematopoiesis, Capri, 13-14 X 1971, p. 52-66, Milano: The Publishing House "Il Ponte" (1972)
- 178) SCHOOLEY, J.C. and L.J. MAHLMANN: Studies with Anti-Erythropoietin Serum.
In A. S. Gordon, Mario Condorelli, Cesare Peschle (eds.), Regulation of Erythropoiesis; 1st International Conference on Hematopoiesis, Capri, 13-14 X 1971, p. 167-176, Milano: The Publishing House "Il Ponte" (1972)

- 179) SCHOOLEY, J.C. and L.J. MAHLMANN: Evidence for the De Novo Synthesis of Erythropoietin in Hypoxic Rats. *Blood* 40, 662-670 (1972)
- 180) SEGAL, R., G. IZAK and S. FELDMAN: The Effect of Electrical Stimulation of the Hypothalamus on Red Cell Production and Destruction in the Rat.
In Yehuda Matoth (ed.), *Erythropoiesis, Regulatory Mechanisms and Developmental Aspects*; Proceedings of the Tel Aviv University Conference on Erythropoiesis, 27 to 29 July 1970, Petah Tikva, p. 195-201, New York/London: Academic Press
- 181) SHADDUCK, R., D. HOWARD and F. STOHLMAN, Jr.: A Difference in Erythropoietin Production between Anemic and Hypoxic Mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128, 132-136 (1968)
- 182) SHORE, N.A., N. MOVASSAGHI and D. HAMMOND: Quantitative Estimation of Erythropoietin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 46-48 (1968)
- 183) SKJAEELAAEN, P., S. HALVORSEN and M. SEIP: Inhibition of Erythropoiesis by Plasma from Newborn Infants. *Israel J. Med. Sci.* 7, 857-860 (1971)
- 184) STOHLMAN, Jr., F.: Observations on the Physiology of Erythropoietin and Its Role in the Regulation on Red Cell Production. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 77, 710-724 (1969)
- 185) STOHLMAN, Jr., F.: Kinetics of Erythropoiesis.
In A. S. Gordon (ed.), *Regulation of Hematopoiesis*, Vol.1. p. 317-326, New York: Appleton-Century-Crofts, Educational Division, Meredith Corporation (1970)
- 186) STOHLMAN, Jr., F.: Control Mechanisms in Erythropoiesis.
In A. S. Gordon, Mario Condorelli, Cesare Peschle (eds.), *Regulation of Erythropoiesis*; Ist International Conference on Hematopoiesis, Capri, 13-14 X 1971, p. 71-87, Milano: The Publishing House "Il Ponte" (1972)
- 187) STOHLMAN, Jr., F. and G. BRECHER: Humoral Regulation of Erythropoiesis, V. Relationship of Plasma Erythropoietine Level to Bone Marrow Activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 100, 40-43 (1959)

- 188) STOHLMAN, Jr., F., G. BRECHER and R.R. MOORES: Humoral Regulation of Erythropoiesis. VIII. The Kinetics of Red Cell Production and the Effect of Erythropoietin. In L.O. Jacobson and M. Doyle (eds.), Erythropoiesis, p. 162-172, New York & London: Grune & Stratton (1962)
- 189) STOHLMAN, Jr., F., S. EBBE, B. MORSE, D. HOWARD and J. DONOVAN: Regulation of Erythropoiesis. XX. Kinetics of Red Cell Production. Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 156-172 (1968)
- 190) STOHLMAN, Jr., F., D. HOWARD and A. BELAND: Humoral Regulation of Erythropoiesis, XII. Effect of Erythropoietin and Iron on Cell Size in Iron Deficiency Anemia. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113, 986-988 (1963)
- 191) STOHLMAN, Jr., F., G. LUCARELLI, D. HOWARD, B. MORSE and B. LEVENTHAL: Regulation of Erythropoiesis. XVI. Cytokinetic Patterns in Disorders of Erythropoiesis. Medicine 43, 651-660 (1964)
- 192) TAKAKU, F., S. CHIBA and K. NAKAO: Erythropoietic Activity of Kidney Extracts.
In Yehuda Matoth (ed.), Erythropoiesis, Regulatory Mechanisms and Developmental Aspects; Proceedings of the Tel Aviv University Conference on Erythropoiesis, 27 to 29 July 1970, Petah Tikva, p. 150-154, New York/London: Academic Press
- 192a) TARBUTT, R. G.: A Study of Erythropoiesis in the Rat. Exp. Cell. Res. 48, 473-483 (1967)
- 193) TARBUTT, R.G.: Cell Population Kinetics of the Erythroid System in the Rat. The Response to Protracted Anaemia and to Continuous Y-Irradiation. Brit. J. Haemat. 16, 9-24 (1969)
- 194) TARBUTT, R.G.: Erythroid Cell Proliferation in Hypertransfused Rats. Brit. J. Haemat. 17, 191-198 (1969)
- 195) TRENTIN, J.J.: Influence of Hematopoietic Organ Stroma (Hematopoietic Inductive Microenvironments) on Stem Cell Differentiation.
In A. S. Gordon (ed.), Regulation of Hematopoiesis, Vol. 1, p. 161-186, New York: Appleton-Century-Crofts, Educational Division, Meredith Corporation (1970)

- 196) TWENTYMAN, P.R.: The Effects of Repeated Doses of Bacterial Endotoxin on Erythropoiesis in the Normal and Splenectomized Mouse. *Brit. J. Haemat.* 22, 169-177 (1972)
- 197) VAN DYKE, D.C.: Sources and Properties of Human Urinary Erythropoietin. in G.E.W. Wolstenholme & M.O.O'Connor (eds.), Ciba Foundation Symposium on Haemopoiesis: Cell Production and Its Regulation, p. 397-422, London: J. & A. Churchill (1960)
- 198) VAN DYKE, D. and M. POLLYCOVE: The Relation of Erythropoietin to Anemia and Polycythemia. In L.O. Jacobson and M. Doyle (eds.), Erythropoiesis, p. 340-350, New York & London: Grune & Stratton (1962)
- 199) WALDMANN, T.A., W.F. ROSSE and R.L. SWARM: The Erythropoiesis-Stimulating Factors Produced by Tumors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 509-515 (1968)
- 200) WARD, H.P., J.E. KURNICK, M.J. PISARCZYK: Serum Level of Erythropoietin in Anemias Associated with Chronic Infection, Malignancy, and Primary Hematopoietic Disease. *J. Clin. Invest.* 50, 332-335 (1971)
- 201) WHITCOMB, W.H. and M.Z. MOORE: The Inhibitory Effect of Plasma from Hypertransfused Animals on Erythrocyte Iron Incorporation in Mice. *J. Lab. Clin. Med.* 66, 641-651 (1965)
- 202) WHITCOMB, W.H. and M.Z. MOORE: Erythropoietic Inhibitory Effect of Plasma from Hypertransfused Animals. *J. Lab. Clin. Med.* 64, 1017-1018 (1964)
- 203) WHITCOMB, W.H. and M. MOORE: The Physiological Significance of an Erythropoietic Inhibitor Factor Appearing in Plasma Subsequent to Hypertransfusion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149, 462-471 (1968)
- 204) WOLTERS, H.-G.: Zur Wirkung von Kobalt auf die Erythropoese. *Blut* 21, 105-117 (1970)

- 205) YOFFEY, J. M., R.V. JEFFREYS D.G. OSMOND, M.S. TURNER, S.C. TAHSIN and P.A.R. NIVEN: Studies on Hypoxia. VI. Changes in Lymphocytes and Transitional Cells in the Marrow During the Intensification of Primary Hypoxia and Rebound. Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 179-192 (1968)
- 206) YOFFEY, J.M., N.C.W. SMITH and R.S.E. WILSON: Studies on Hypoxia. V. Changes in the Bone Marrow During Hypoxia at 10,000 and 20,000 Feet. Scand. J. Haemat. 4, 145-157 (1967)
- 207) ZANJANI, E.D., A.S. GIDARI, A.S. GORDON and C. PESCHLE: Further Studies on the Mechanism of Erythropoietin Formation by the Kidney.
In A. S. Gordon, Mario Condorelli, Cesare Peschle (eds.), Regulation of Erythropoiesis; Ist International Conference on Hematopoiesis, Capri, 13-14 X 1971, p. 205-215, Milano: The Publishing House "Il Ponte" (1972)

Herrn Priv. Doz. Dr. P. Dörmer, unter dessen gemeinsamer Leitung sowohl die klinischen als auch die experimentellen Teile der Arbeit entstanden sind, bin ich für seine Unterstützung und Förderung besonders zu Dank verpflichtet.

Frl. U. Kiehn und Fr. P. Wohlhüter danke ich für ihre Hilfe bei der Vorbereitung des Manuskripts.

L E B E N S L A U F

Am 20. Mai 1943 wurde ich in München als Sohn des Beamten Franz Hegemann und seiner Ehefrau Anna geboren. Nach 7 Jahren Volksschule und 3 Jahren Wirtschaftsaufbauschule erhielt ich eine vollständige Berufsausbildung als Industriekaufmann bei der M.A.N., München (1959 - 1962). 1962 - 1965 erwarb ich auf dem 2. Bildungsweg am München-Kolleg die Hochschulreife und studierte anschließend 11 Semester Medizin an der Universität München. Nach dem Staatsexamen im Sommer 1971 arbeitete ich an der 1. Medizinischen Klinik der Universität München und an verschiedenen Kreiskrankenhäusern als Medizinalassistent. Seit August 1973 bin ich als wissenschaftlicher Assistent am Institut für Hämatologie der GSF, Assoziation mit EURATOM, tätig. Mein Antrag auf Bestallung als Arzt wurde vor kurzem eingereicht.

